



PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the application of:

Attorney Docket No.: 3338.100US01

Pratelli et al.

Confirmation No.: 4338

Application No.: 10/588,361

Examiner: David H. Kruse, Ph.D.

Filed: October 24, 2006

Group Art Unit: 1638

For: POTASSIUM CHANNELS

---

DECLARATION PURSUANT TO 37 C.F.R. § 1.132 and/or 1.825

I, Hervé SENTENAC (address: INRA-CNRS Institute "Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes", INRA, Place Viala, F-34060 Montpellier cedex 1), Directeur de Recherche de première classe INRA, PhD, declares under penalty of perjury that the following is true and correct to the best of my knowledge, information and belief:

1. I am a named inventor on U.S. Patent Application Serial No. 10/588,361, entitled "Potassium Channels" and filed on October 24, 2006, which claims priority to PCT Application No. PCT/FR05/05006 filed January 31, 2005 and French Application No. FR 04 50199 filed February 3, 2004.

2. I was one of the inventors that discovered a VvSOR gene in *Vitis Vinifera* which encodes a new outward rectifier potassium channel comprising 795 amino acids, with a molecular weight of approximately 91.2 kDa (length of the cloned cDNA: 2449 bases; Cf. NCBI database, AJ490336.1).

3. In providing the sequence code for the VvSOR gene to our patent agent for filing patent applications, the wrong sequence code was unintentionally provided.

The wrong sequence code was for the *VvSIRK* gene from *Vitis Vinifera*. The *VvSIRK* cDNA sequence (2376 bases) codes for the inward rectifier potassium channel *VvSIRK*, as it has been published in Plant Physiology, 128: 564-577 (February 2002) by Pratelli et al., as evidenced by the attached publication.

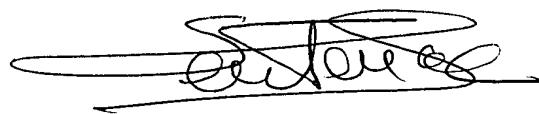
4. While a correct *VvSOR* gene in *Vitis Vinifera* which encodes a new outward rectifier postassium channel was discussed in the patent application, the wrong sequence code was included in the patent application. This error of providing the wrong sequence code was unintentional.

5. The correct sequence code for the *VvSOR* gene in *Vitis Vinifera*, which encodes a new outward rectifier potassium channel, was in our possession at the time the patent application was filed. Evidence of this prior possession is illustrated by the attached documents, which correspond to PhD Thesis of two students I supervised: (i) PhD Thesis of Réjane PRATELLI (defended on December 12, 2000) "Identification et caractérisation de canaux potassiques chez la vigne" (English translation: identification and characterization of potassium channels in grapevine), and (ii) PhD Thesis of Eric HOSY (defended on November 22, 2004) "Propriétés fonctionnelles et rôles physiologiques de canaux potassiques de type Shaker chez *Arabidopsis thaliana* et *Vitis vinifera*" (English translation: Functional properties and physiological roles of K<sup>+</sup> channels from the Shaker family in *Arabidopsis thaliana* and *Vitis vinifera*). These documents show that the *VvSOR* gene in *Vitis Vinifera*, which encodes a new outward rectifier postassium channel, was public at least in December 2000, and that transgenic grapevines (time required for grapevine transformation, regeneration, growth and production of berries: at least 3 year) expressing *VvSOR* constructs were under studies

during summer 2003 and summer 2004. A draft of a publication presenting (in English) the work of our research group on VvSOR (cloning, expression analyses, functional characterization and preliminary results observed in transgenic grapevines during the two successive years 2003 and 2004) is included in the PhD Thesis of Eric Hosy.

6. Based upon the foregoing evidence, one skilled in the art would not only recognize the existence of the error of the sequence listing in the patent specification, but also recognize the appropriate correction.

Executed this 16 of July, 2009



---

Hervé SENTENAC  
Biochimie et Physiologie  
Moléculaire des Plantes  
INRA, Place Viala  
F-34060 Montpellier cedex 1  
France

**BIOCHIMIE & PHYSIOLOGIE  
MOLECULAIRE DES PLANTES**  
UMR CNRS / INRA / SUPAGRO / UM II  
Bât. 7 - Institut de Biologie Intégrative des Plantes  
2, Place Pierre Viala - 34060 Montpellier Cedex 1 - France

**Hervé SENTENAC**  
Directeur Adjoint

## **PhD Thesis of Réjane Pratelli**

Thesis defended on December 12, 2000 (as indicated on the cover).

Research work performed from November 1997 to November 2000.

Thesis Supervisor: Hervé SENTENAC

**Chapter 4, Page 78-100:** cloning, expression in planta and functional characterization of the VvSOR gene (Vitis vinifera Shaker Outward Rectifier).

**Figure 4.2** (present in between page 79 and 80): this Figure provides the amino acid sequence of VvSOR channel. The sequence of VvSOR is compared (amino acid sequence alignments) in this Figure to that of the outward Shaker potassium channels SKOR and SKOR2 (also named GORK) previously cloned in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

**Chapter 2:** "Material and Methods", page 59, paragraph 2.6.2. Description of the technical procedure used to prepare transgenic grapevines over-expressing the VVSOR channel (wild-type or mutated sequences) to investigate the role of this channel in planta. The corresponding grapevines will be characterized in summer 2003 and 2004. See below, PhD Thesis of Eric Hosy.

## **PhD Thesis of Eric Hosy**

Thesis defended on November 22, 2004 (as indicated on the copy of the report from the Examination board attached to the Thesis).

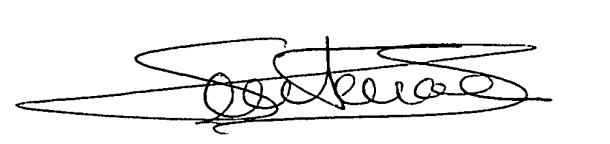
Research work performed from November 2001 to October 2004.

Thesis Supervisor: Hervé SENTENAC

**Page 118-137**, text in English: first draft of a manuscript describing parts of the work of Réjane Pratelli, Eric Hosy and other Inventors on VvSOR: VvSOR cloning, functional analysis of VvSOR channel activity by two-electrode voltage clamp using *Xenopus* oocytes as heterologous expression system, localization of VvSOR expression in the plant and preliminary studies of the roles of VvSOR in the development of the grape berry using transgenic grapevines over-expressing the wild-type VvSOR gene. Please note that obtaining transgenic grapevines, from the transformation step to fructification and production of berries, took 4 years.

**BIOCHIMIE & PHYSIOLOGIE  
MOLECULAIRE DES PLANTES**  
UMR CNRS / INRA / SUPAGRO / UMII  
Bât. 7 - Institut de Biologie Intégrative des Plantes  
2, Place Pierre Viala - 34060 Montpellier Cedex 1 - France

**Hervé SENTENAC**  
Directeur Adjoint

  
Hervé SENTENAC

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

N° attribué par la bibliothèque

1111111111

THESE

Présentée à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier  
pour obtenir le DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : Physiologie Moléculaire

Formation doctorale : Développement et Adaptation des Plantes  
Ecole Doctorale : Biologie Intégrative

Laboratoire de Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes  
UMR 5004 Agro-M/CNRS/INRA/UM2-Montpellier

**Identification et caractérisation de canaux potassiques chez la vigne  
vers une amélioration de la balance acido-basique de la vendange**

par

Réjane PRATELLI

Soutenue le 12 décembre 2000 devant le jury composé de :

M. Michel BOULAY, Responsable département végétal LVMH Recherche, Epernay	Examinateur
M. André CHARRIER, Professeur, ENSA-M	Président
M. Serge DELROT, Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur
M. Michel DELSENY, Professeur, Université de Perpignan	Examinateur
M. Jean-Pierre RENAUDIN, Professeur, Université de Bordeaux	Rapporteur
M. Hervé SENTENAC, Directeur de recherche, INRA, Montpellier	Directeur de thèse

# ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

N° attribué par la bibliothèque  
\_\_\_\_\_

## THESE

Présentée à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier  
pour obtenir le DIPLOME DE DOCTORAT

**Spécialité : Physiologie Moléculaire**

Formation doctorale : Développement et Adaptation des Plantes  
Ecole Doctorale : Biologie Intégrative

Laboratoire de Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes  
UMR 5004 Agro-M/CNRS/INRA/UM2-Montpellier

## **Identification et caractérisation de canaux potassiques chez la vigne vers une amélioration de la balance acido-basique de la vendange**

par

Réjane PRATELLI

Soutenue le 12 décembre 2000 devant le jury composé de :

M. Michel BOULAY, Responsable département végétal LVMH Recherche, Epernay	Examinateur
M. André CHARRIER, Professeur, ENSA-M	Président
M. Serge DELROT, Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur
M. Michel DELSENY, Professeur, Université de Perpignan	Examinateur
M. Jean-Pierre RENAUDIN, Professeur, Université de Bordeaux	Rapporteur
M. Hervé SENTENAĆ, Directeur de recherche, INRA, Montpellier	Directeur de thèse

## Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier le professeur Claude Grignon, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, et pour ses conseils lors de la préparation de ma soutenance.

Merci également à Jean-Pierre Renaudin et à Serge Delrot du temps qu'ils m'ont consacré en tant que rapporteurs de cette thèse, et à Michel Boulay, Michel Delseney et André Charrier d'avoir accepté de juger ce travail.

Passons ensuite à celui qui sera toujours, selon son expression favorite, "mon directeur de thèse préféré". Tu m'as beaucoup appris pendant ces trois ans, non-seulement sur le plan scientifique, mais aussi sur le plan humain, tout en respectant ma personnalité et mes envies. Cette thèse que tu m'a proposée restera pour moi un cadeau magnifique. Dis-moi quand même : tu maintiens toujours que tu n'as jamais été "stressé"...?

Merci aussi à JB, qui a eu la patience de m'inculquer les bases de l'électrophysiologie, et qui a répondu à tous mes appels au secours sans trop se lasser et surtout, sans peur de mon caractère explosif (enfin, en apparence...).

Comment remercier à sa juste valeur Frédéric de son aide et ses précieux conseils ? Comme tu me l'as déjà dit, entre scorpions, on se comprend à demi-mot. Alors tout simplement : merci, chef.

Je n'oublie pas Jo, grand manitou du clonage, et tous ces petits services mutuels qui simplifient tant la vie, nos grandes heures de séquençage et les touches de folie, les petites vannes et les blagues vaseuses qui rappellent que dans la BM, pour que ça marche, il faut toujours une pincée de poudre de perlumpinpin...

Laurent, tu m'as offert toi aussi un cadeau de valeur : une clé pour le "monde merveilleux des cals embryogènes" et la découverte de la transformation de la vigne. Cette thèse te doit énormément. Evidemment, je l'ai payé plutôt cher : qu'elles furent longues, ces heures de repiquage, à assurer ton standard téléphonique en subissant Fun Radio... Et tout cela pour faire des taches bleues sur des feuilles de vigne... J'espère que tu t'en remettras un jour !!!

Il serait un peu long de nommer tous les membres de "Viti" que je dois remercier, mais je tiens à leur témoigner ma vive reconnaissance pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée. Une pensée particulière pour Valérie Laucou, et toutes ses PCR de cartographie. Qui a dit que le matériel vigne n'est pas facile à manipuler ?

Impossible d'oublier sur cette page mon vieux complice, Guillaume. Il y a eu, bien sûr, ces longues conversations techniques ou stratégiques, quand les solutions viennent plus facilement à deux; les délires des ménages révolutionnaires du samedi après-midi; les coups de folie que tu as supportés, les déprimes que tu as effacées... Et puis aussi, les randos (mes genoux s'en souviendront longtemps), la photo (LA polémique du cadrage), les Dalton, les tomates, Ramoth et Mnementh, et le mystère des Pyramides... et ces petits riens qui font le prix de l'amitié.

Avec nos multiples changements de bureau, on aurait pu croire qu'on voulait vraiment nous séparer, Carine et moi. Comme si nous n'étions pas vraiment les petites filles modèles que

nous paraîssons... Mais on a fini par se retrouver !! Et là, dans ce dernier bureau, il faut bien avouer que tu as été héroïque. Merci d'avoir supporté la période de rédaction avec bonne humeur et beaucoup de prévenances. Merci aussi pour ces discussions sur nos problèmes, nos petites médisances, nos fous rires et ces bons moments partagés, qui font de ce bureau le coin le plus sympa du labo.

Merci aussi au roi du système D, de la photo numérique et des MP3, ou, en résumé, à Jérôme-la bonne humeur. Combien de journées et soirées sauvées par une petite visite, vers 17h30, dans ton royaume, pour découvrir ton dernier fond d'écran, ou les frasques de ceux qui nous entourent ?

Benoît a accepté de caractériser ces deux canaux de vigne... peut-être parce qu'il est un fervent disciple de Dionysos. Il a lui aussi bien contribué à mon éducation en Électrophysiologie. Je t'en remercie, et je n'oublie pas la gentillesse et la disponibilité dont tu as fait preuve à mon égard.

Une mention spéciale pour toi, Gamin, pour ton aide inattendue, mais fort appréciée lors de la conception de l'oral, et pour ton soutien. Merci à tous ceux qui m'ont remonté le moral et changé les idées par un simple sourire ou quelques mots : Sabine, Raphaël, Domi, Hélène, Céline, Jean-Mi... Je n'oublie pas les " anciens ", Cyril et Serge, et leur(s) philosophie(s) de la vie, et tous les membres de l'équipe. Et puis les deux Sophie, Gilles, Franck, pour leur gentillesse et leur servabilité. Ainsi que tous ceux qui m'ont rendu service sans parfois même me connaître : M. Yvon, C. Troulet, N. Alcon, C. Daverede...; et bien sûr, Cyrille Forestier pour sa bonne volonté et son obstination à essayer de produire des protoplastes de cellules de garde de vigne.

Pour finir sur une touche perso, je dois remercier la plus fidèle des amies, Karine, toujours à l'écoute et prête à tout révolutionner pour m'aider à sortir d'une passe difficile.

Sans oublier mes parents et grands-parents, qui, de loin, m'ont encouragée et soutenue tout au long de mes études, sans laisser paraître leurs inquiétudes. Et que ma soeur sache que nos coups de fil, si longs soient-ils, ne remplaceront jamais sa présence...

## Abréviations

ABA : acide abscissique  
ADNc : ADN complémentaire  
ARNc : ARN complémentaire  
ARNm : ARN messager  
BEt : bromure d'éthydium  
BSA : albumine de sérum de bœuf  
CI : mélange chloroforme/alcool isoamylque (48/2)  
CTAB : bromure d'hexadécyltriméthylammonium  
DEPC : diéthylpyrocarbonate  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate  
DTT : dithiothréitol  
EDTA : acide éthylénediaminetétraacétique  
GUS :  $\beta$ -glucuronidase  
HEPES : N(2-hydroxyethyl) piperazine N'(2-ethanesulfonic acid)  
kpb : kilopaire de bases  
LB : milieu de Luria et Bertani  
MES : acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique  
MS : milieu de Murashige et Skoog  
MOPS : acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique  
NMPC : nucléotide monophosphate cyclique  
NOA : acide  $\beta$ -naphtoxyacétique  
NORC : canal cationique non sélectif à rectification sortante  
*NPTII* : néomycine phosphotransférase  
pb : paire de bases  
PCI : mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylque (50/48/2)  
PCR : réaction en chaîne à la polymérase  
PEG : polyéthylène glycol  
PEP : phosphoénol pyruvate  
pfu : unité formant une plage de lyse  
PVPP : polyvinyl polypyrrolidone  
p/v : rapport poids/volume  
RACE : amplification rapide des extrémités d'ADNc  
RT : transcription inverse  
rpm : rotation par minute  
SDS : dodécylsulfate de sodium  
TAE : tampon tris-acide acétique-EDTA  
TE : tampon tris-EDTA  
TEA : tétraéthyl ammonium  
Tris : tris-(hydroxyméthyl)aminométhane  
U.V. : ultra-violet  
v/v : rapport volume/volume  
X-Gluc : 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-glucuronide

## Table des matières

<i>Table des matières .....</i>	<i>1</i>
<b><i>Chapitre 1 Introduction .....</i></b>	<b><i>6</i></b>
<b>1.1 Rôles de l'ion potassium dans la plante .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 L'absorption de K<sup>+</sup> par les tissus végétaux : données cinétiques et thermodynamiques .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Des canaux et des transporteurs participent aux transports de K<sup>+</sup> chez les plantes ...</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Les transporteurs de K<sup>+</sup> .....</b>	<b>10</b>
1.4.1 La famille KUP .....	10
1.4.2 La famille HKT .....	11
<b>1.5 Les canaux potassiques de type Shaker .....</b>	<b>12</b>
1.5.1 Les canaux Shaker animaux .....	12
1.5.2 Les canaux Shaker d' <i>Arabidopsis</i> .....	13
1.5.3 Les autres canaux Shaker végétaux .....	17
<b>1.6 Les autres canaux potassiques végétaux .....</b>	<b>18</b>
1.6.1 Les familles KCO1 et KCO3 .....	18
1.6.2 La famille des cNGC .....	19
<b>1.7 Absorption du potassium par la racine.....</b>	<b>20</b>
1.7.1 Le transport dans le domaine des faibles concentrations .....	20
1.7.2 Le transport dans le domaine des fortes concentrations .....	20
1.7.3 Régulation de l'absorption racinaire .....	22
<b>1.8 Transport du potassium dans la sève xylémienne.....</b>	<b>23</b>
1.8.1 Données électrophysiologiques et moléculaires .....	24
1.8.2 Régulation de l'activité des canaux potassiques exprimés dans la stèle racinaire .....	25
<b>1.9 Transport du potassium dans la sève phloémienne .....</b>	<b>25</b>
1.9.1 Les systèmes de transport exprimés dans le phloème .....	26
1.9.2 Transport phloémien et re-circulation de K <sup>+</sup> dans la plante .....	27
<b>1.10 Les flux de potassium dans la cellule de garde.....</b>	<b>27</b>
1.10.1. Mouvements stomatiques et canaux potassiques .....	27
1.10.2. Régulation de l'activité des canaux potassiques de la cellule de garde .....	28
<b>1.11 Biologie générale des fruits de la vigne .....</b>	<b>30</b>
1.11.1 Morphogenèse et structure de la baie .....	30
1.11.2 Aspects généraux du développement de la baie .....	31

<b>1.12 Aspects physiologiques et biochimiques de la maturation des baies.....</b>	<b>33</b>
1.12.1 Modifications structurales .....	33
* Mise en évidence de discontinuités du xylème .....	33
* Modification de l'apport des solutés vers les baies .....	34
1.12.2 Flux d'acides organiques .....	34
1.12.3 Flux de sucres.....	37
1.12.4 Flux d'eau au cours de la maturation des baies .....	38
<b>1.13 Le potassium chez la vigne.....</b>	<b>41</b>
1.13.1 Le potassium dans les parties végétatives .....	41
1.13.2 Le potassium dans les baies .....	42
 <i>Chapitre 2 Matériel et Méthodes .....</i>	 <b>46</b>
<b>2.1 Matériel végétal.....</b>	<b>46</b>
2.1.1 Culture de sarments de vigne sur perlite .....	46
2.1.2 Culture en hydroponie de boutures de vigne.....	46
2.1.3 Culture d'entretien des cals embryogènes de vigne .....	46
2.1.4 Culture d' <i>Arabidopsis</i> .....	46
<b>2.2 Criblage de banques d'ADN de vigne .....</b>	<b>47</b>
2.2.1 Matériel biologique .....	47
2.2.2 Préparation de bactéries compétentes pour l'infection de bactériophages.....	47
2.2.3 Etalement des bactériophages .....	48
2.2.4 Répliques.....	48
2.2.5 Hybridation.....	48
2.2.6 Carottage des plages positives.....	49
2.2.7 Obtention et analyse des inserts des bactériophages de la banque d'ADNc .....	49
2.2.8 Production d'ADN des phages des banques génomiques .....	49
<b>2.3 Purification et analyse des acides nucléiques .....</b>	<b>50</b>
2.3.1 Purification des ARN totaux .....	50
2.3.2 Purification d'ADN génomique de vigne .....	52
2.3.3 Fractionnement des acides nucléiques sur gel d'agarose et transfert sur membrane de Nylon.....	53
2.3.4 Hybridation moléculaire.....	54
<b>2.4 Amplification des acides nucléiques par PCR.....</b>	<b>55</b>
2.4.1 PCR .....	55
2.4.2 5'-RACE .....	55
2.4.3 RT-PCR .....	56
2.4.4 RT-PCR quantitative.....	56

<b>2.5 Autres techniques de biologie moléculaire .....</b>	<b>57</b>
2.5.1 Clonage.....	57
2.5.2 Mutagénèse.....	57
<b>2.6 Transformation génétique.....</b>	<b>58</b>
2.6.1 Construction du gène rapporteur promoteur <i>SIRK:GUS</i> .....	58
2.6.2 Construction des chimères promoteur 35S-ADNc <i>SOR</i> .....	59
2.6.3 Transformation des agrobactéries .....	59
2.6.4 Transformation des plantules d' <i>Arabidopsis</i> .....	60
2.6.5 Transformation des cals embryogènes de vigne.....	60
<b>2.7 Analyse de l'activité GUS dans les plantes transgéniques.....</b>	<b>63</b>
<b>2.8 Caractérisation électrophysiologique des canaux exprimés dans les ovocytes de xénope.....</b>	<b>64</b>
2.8.1 Les plasmides d'expression .....	64
2.8.2 Expression dans l'ovocyte de xénope .....	65
2.8.3 Patch-clamp.....	67
2.8.4 Programmes de "voltage-clamp" (potentiel imposé).....	68
2.8.5 Détermination de la conductance unitaire du canal.....	69
2.8.6 Mesure du pH intracellulaire de l'ovocyte.....	70
 <i>Chapitre 3 Identification de deux séquences de canaux potassiques de vigne.....</i>	<b>72</b>
<b>3.1 Criblage de la banque d'ADNc de baies .....</b>	<b>72</b>
3.1.1 Matériel expérimental .....	72
3.1.2 Criblage .....	73
3.1.3 Résultats .....	73
<b>3.2 Criblage de la banque génomique .....</b>	<b>74</b>
3.2.1 Procédé expérimental .....	74
3.2.2 Résultats .....	75
<b>3.3 Seconde série de criblages de banques d'ADNc .....</b>	<b>76</b>
3.3.1 Origine de banque d'ADNc de cellules en culture .....	76
3.3.2 Les sondes .....	76
3.3.3 Résultats .....	76
<b>3.4 Conclusion .....</b>	<b>76</b>
 <i>Chapitre 4 Caractérisation d'un canal potassique à rectification sortante.....</i>	<b>78</b>
<b>4.1 Obtention de l'ADNc <i>SOR</i> complet .....</b>	<b>78</b>
4.1.1 Identification de clones génomiques .....	78
4.1.2 Obtention du début de la séquence par 5'-RACE .....	79
4.1.3 Analyse de la séquence polypeptidique déduite de l'ADNc .....	80

<b>4.2 Analyse de la structure du gène <i>SOR</i> par PCR.....</b>	<b>80</b>
4.2.1 Approche expérimentale .....	80
4.2.2 Résultats .....	81
4.2.3 Nombre de copies du gène .....	82
<b>4.3 Caractérisation fonctionnelle de <i>SOR</i> dans l'ovocyte de xénope .....</b>	<b>82</b>
4.3.1 Analyse par voltage-clamp à deux électrodes .....	83
4.3.2 Analyse en patch-clamp : détermination de la conductance unitaire du canal .....	85
<b>4.4 Localisation de l'expression du gène <i>SOR</i> dans la plante .....</b>	<b>87</b>
4.4.1 Extraction d'ARN .....	87
4.4.2 Localisation de l'expression par Northern Blot .....	89
4.4.3 Localisation de l'expression par RT-PCR.....	90
<b>4.5 Quantification de l'abondance des transcrits <i>SOR</i> .....</b>	<b>91</b>
4.5.1 Méthodes .....	91
4.5.2 Quantification de l'expression .....	93
<b>4.6 Discussion .....</b>	<b>93</b>
4.6.1 Analyse des séquences .....	93
4.6.2 Analyse fonctionnelle du canal <i>SOR</i> .....	95
4.6.3 Analyse de l'expression.....	97
4.6.4 Rôle potentiel de <i>SOR</i> dans la plante .....	99

<b><i>Chapitre 5 Caractérisation d'un canal potassique entrant exprimé dans les cellules de garde .....</i></b>	<b>101</b>
<b>5.1 Présentation de la séquence du gène <i>SIRK</i> .....</b>	<b>101</b>
5.1.1 La séquence codante.....	101
5.1.2 Nombre de copies du gène .....	102
<b>5.2 Clonage de l'ADNc <i>SIRK</i>.....</b>	<b>103</b>
5.2.1 Principe technique du clonage.....	103
5.2.2 Résultats .....	104
<b>5.3 Caractérisation fonctionnelle de <i>SIRK</i> .....</b>	<b>105</b>
5.3.1 travail préalable à l'expression dans les ovocytes de xénope.....	105
5.3.2 Caractérisation fonctionnelle.....	106
<b>5.4 Analyse de l'expression de <i>SIRK</i> par RT-PCR .....</b>	<b>111</b>
5.4.1 Localisation de l'expression.....	111
5.4.2 Aspects quantitatifs de l'expression de <i>SIRK</i> .....	111
<b>5.5 Localisation de l'expression de <i>SIRK</i> par utilisation du gène rapporteur <i>GUS</i>.....</b>	<b>113</b>
5.5.1 Etude en système hétérologue .....	113
5.5.2 Etude en système homologue .....	114

<b>5.6 Discussion .....</b>	<b>116</b>
5.6.1 Analyse des séquences .....	116
5.6.2 Propriétés fonctionnelles de SIRK .....	118
5.6.3 Analyse de l'expression de <i>SIRK</i> .....	119
 <i>Chapitre 6 Conclusions et perspectives</i> .....	 122
Cadre général du programme.....	122
Analyse des déterminants moléculaires du transport de K <sup>+</sup> chez la vigne : identification de deux canaux potassiques .....	122
Expression de canaux mutants dominants négatifs : élucidation du rôle des canaux dans la plante et analyse des effets d'une perturbation des transports de K <sup>+</sup> sur la physiologie de la baie .....	125
 <i>Références bibliographiques</i> .....	 128

## Chapitre 1

### Introduction

*En vignoble à vin, le suivi du développement des baies, dans le but de prévoir la qualité du millésime et les opérations œnologiques, repose sur la mesure périodique de la teneur en sucres, mais aussi de l'acidité de titration, du pH et de la teneur en K<sup>+</sup> de la pulpe. Ces 3 derniers paramètres sont liés. En effet, en tant que cation endocellulaire le plus abondant, l'ion K<sup>+</sup> est impliqué dans la neutralisation électrique des acides organiques, et participe de ce fait au contrôle du pH et de l'équilibre acido-basique de la pulpe. De nombreuses études montrent qu'une alimentation potassique trop riche se traduit par un déséquilibre de l'acidité du moût (Hale, 1977; Storey, 1987; Delas et al., 1989).*

*La teneur en K<sup>+</sup> des moûts varie avec les conditions climatiques du millésime, les pratiques agronomiques (fertilisation, taille), mais aussi le porte-greffe et le cultivar. Cette variabilité biologique suggère que les techniques d'amélioration des plantes ou de génie génétique devraient permettre, à terme, d'obtenir un matériel biologique permettant de diminuer sensiblement la teneur en K<sup>+</sup> des baies et d'augmenter ainsi l'acidité des moûts. Cela autoriserait une réduction significative des traitements œnologiques et représenterait une avancée durable dans l'amélioration des vins, à la fois sur le plan de leur qualité organoleptique et de la sécurité alimentaire. Une stratégie serait de diminuer spécifiquement la teneur en potassium de la baie, sans affecter la teneur des autres organes et tissus, de façon à ne pas limiter le développement et le fonctionnement de la canopée à l'origine de la synthèse des sucres. Le projet de cette thèse s'inscrit dans cette direction. Le premier objectif a été l'identification de systèmes de transport de K<sup>+</sup> susceptibles de participer au transfert de cet ion dans la baie.*

*En introduction bibliographique, je présenterai d'abord un résumé de nos connaissances sur les rôles que joue K<sup>+</sup> dans la cellule végétale et la plante. Je ferai ensuite le point sur les acquis moléculaires concernant les protéines membranaires responsables des transports de K<sup>+</sup> dans la plante, disponibles essentiellement chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*. Je résumerai ensuite les connaissances actuelles concernant les transports de cet ion chez les plantes, en particulier l'absorption par la racine, les transports à longue distance par les sèves phloémienne et xylémienne, et les flux dans les cellules de garde. Je présenterai enfin les données disponibles sur le développement et la physiologie de la baie de raisin, et les rôles que K<sup>+</sup> joue dans certains de ces processus.*

## 1.1 Rôles de l'ion potassium dans la plante

La concentration de  $K^+$  dans le cytoplasme de la cellule animale ou végétale est de l'ordre de  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  (Darnel *et al.*, 1989; Maathuis et Sanders, 1996). La concentration cytoplasmique de  $Na^+$  est proche de  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  chez les cellules animales. Les données chez les cellules végétales sont relativement rares et indirectes. Elles suggèrent néanmoins que cette concentration est variable en fonction de l'espèce et de l'environnement, mais inférieure à celle de  $K^+$  (Cheeseman, 1988). La concentration cytoplasmique de  $Mg^{2+}$  est proche de  $1 \text{ mmol.l}^{-1}$ , dans la cellule animale ou végétale (Darnel *et al.*, 1989), et la concentration de  $Ca^{2+}$  est contrôlée à des valeurs inférieures à  $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (Darnel *et al.*, 1989; Felle, 1898), en relation avec le rôle de second messager de ce cation. En conclusion,  $K^+$  est le cation inorganique le plus abondant dans le cytoplasme. On imagine que cette accumulation préférentielle est due aux propriétés physiques de cet ion (rayon ionique et structure de la coque d'hydratation en particulier) qui le rendent faiblement chaotropique (Eisenman, 1969; Clarkson et Hanson, 1980; Eisenman et Horn, 1983; Clarkson, 1993).

En relation avec son abundance dans la cellule,  $K^+$  est impliqué dans des fonctions de base, au niveau de la cellule et à celui de l'organisme. Il constitue le principal contre-ion neutralisant la charge négative nette des macromolécules et détermine ainsi la force ionique du cytoplasme et l'intensité des interactions électrostatiques inter- et intra-moléculaires. Cela contribue en particulier au maintien de la structure et de l'activité des complexes enzymatiques. Le potassium exerce de plus un effet activateur direct sur plusieurs enzymes (Lüttge et Clarkson, 1989), par exemple dans les complexes impliqués dans les étapes de traduction des ARNm ou la synthèse de l'amidon (Lüttge et Clarkson, 1989). Enfin, les flux de  $K^+$  entre la cellule et son environnement sont rapides (la conductance membranaire est dominée par la conductance potassique) et leur régulation participe au contrôle du potentiel électrique transmembranaire. Ces rôles au niveau cellulaire se traduisent, au niveau de la plante entière, par une implication dans de nombreuses fonctions comme le contrôle des échanges gazeux via la régulation de l'ouverture des stomates (MacRobbie, 1998; Assman et Shimazaki, 1999), l'élaboration du gradient de potentiel osmotique responsable du flux de sève phloémienne entre les organes sources et puits, la neutralisation des acides organiques ou inorganiques dans la sève xylémienne, et probablement des processus de signalisation.

La concentration de  $K^+$  dans le cytoplasme est maintenue relativement constante, même dans les situations de carence. En revanche, sa concentration dans la vacuole est très variable (Walker *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1996). La vacuole joue un rôle de réserve, permettant l'homéostasie du cytoplasme. En fait, la quantité de  $K^+$  qu'elle contient est généralement plus importante que celle du cytoplasme, compte tenu des valeurs relatives des volumes des compartiments vacuolaire et cytoplasmique. L'accumulation de  $K^+$  dans la vacuole participe au contrôle de la pression osmotique et de la turgescence des cellules (Clarkson et Hanson,

1980), ce qui constitue donc un rôle prépondérant dans les fonctions connexes comme la régulation de l'elongation cellulaire.

## 1.2 L'absorption de K<sup>+</sup> par les tissus végétaux : données cinétiques et thermodynamiques

L'isotope <sup>42</sup>K<sup>+</sup> présentant une durée de vie trop brève pour une utilisation commode, les caractéristiques cinétiques de l'absorption de K<sup>+</sup> par les tissus ont été analysées le plus souvent à l'aide du traceur radioactif <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>. L'analyse de la vitesse initiale d'incorporation du traceur en fonction de la concentration fait apparaître une cinétique complexe qui peut être décrite comme la somme de deux hyperboles ou d'une hyperbole et d'une droite (Epstein *et al.*, 1963). Cette observation très générale, faite initialement par le groupe d'Epstein dans les années 60, a conduit à deux grandes conclusions qui ont ensuite servi de cadre commun aux études des mécanismes responsables des transports membranaires de solutés par les tissus. L'allure hyperbolique des cinétiques suggéra une analogie avec les réactions enzymatiques classiques, décrites par le formalisme développé par Michaelis et Menten (1913), et le franchissement de la membrane par un soluté fut désormais interprété comme le résultat d'une interaction avec une protéine "enzyme" de transport, caractérisée par les deux paramètres K<sub>M</sub> et V<sub>max</sub>. L'existence de deux hyperboles, ou d'une hyperbole et d'une portion de droite (interprétée comme une portion d'hyperbole décrite par un K<sub>M</sub> très élevé), conduisit à l'hypothèse de deux types de transporteurs se différenciant par leur affinité pour le substrat. L'analyse des cinétiques de transport de K<sup>+</sup> conduit, dans ce cadre, à conclure à l'existence d'un mécanisme de transport à forte affinité (mécanisme 1 d'Epstein) caractérisé par un K<sub>M</sub> de l'ordre de la dizaine de μmol.l<sup>-1</sup>, et d'un mécanisme à faible affinité (mécanisme 2), avec un K<sub>M</sub> de l'ordre de la dizaine de mmol.l<sup>-1</sup> (Epstein *et al.*, 1963; Kochian et Lucas, 1982; Kochian et Lucas, 1985). Le mécanisme à haute affinité est considéré comme responsable de l'absorption dans le domaine des faibles concentrations, inférieures à la centaine de μmol.l<sup>-1</sup>. Au-delà, le prélèvement résulterait de l'activité du mécanisme à faible affinité (qui présente en contre-partie une valeur de V<sub>max</sub> élevée).

Outre le fait qu'ils présentent des différences d'affinité pour K<sup>+</sup>, les mécanismes 1 et 2 se distinguent par leur sélectivité pour ce cation vis-à-vis des autres cations, et notamment de Na<sup>+</sup>, ainsi que par leur sensibilité à Ca<sup>2+</sup>, à l'anion accompagnant K<sup>+</sup> dans le milieu et à divers effecteurs (Rains et Epstein, 1967a; Rains et Epstein, 1967b; Kochian *et al.*, 1985). Alors que l'ajout de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dans le milieu se traduit par une inhibition des deux mécanismes (Vale *et al.*, 1987), la présence de Na<sup>+</sup> ou de TEA (un bloqueur classique des canaux potassiques) n'affecte que le mécanisme 2 (Rains et Epstein, 1967b; Kochian et Lucas, 1982; Kochian *et al.*, 1985). En revanche, le mécanisme 1 est inhibé spécifiquement par des réactifs ayant pour

cible les groupes sulfhydryl (Kochian et Lucas, 1982; Kochian *et al.*, 1985). Ces spécificités ont suggéré que les deux composantes de l'influx de K<sup>+</sup> correspondaient à des transporteurs de nature différente. La sensibilité au TEA a conduit à proposer que les systèmes responsables du mécanisme 2 étaient des canaux (Kochian et Lucas, 1988).

Parallèlement à ces approches cinétiques, les mesures du potentiel électrique transmembranaire et les analyses thermodynamiques ont conduit à distinguer deux types de transport de K<sup>+</sup> en fonction de la concentration de cet ion dans le milieu : un transport actif et un transport passif. Lorsque la concentration de K<sup>+</sup> dans le milieu est faible, l'influx se fait contre le gradient de potentiel électrochimique, et le transport est donc actif. Lorsque la concentration est élevée, l'influx devient passif. En général, les analyses électrophysiologiques conduisent à situer le seuil de concentration en deçà duquel l'influx est obligatoirement actif dans la gamme comprise entre la dizaine et la centaine de  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  (Kochian et Lucas, 1988; Maathuis et Sanders, 1993). Il a été séduisant, pour les auteurs, de faire se correspondre les différents types de transports révélés par les approches cinétiques et thermodynamiques, et d'associer le mécanisme 1 au transport actif, (*i.e.* d'imaginer implicitement ou explicitement un support moléculaire identique), et le mécanisme 2 au transport passif (revue : Kochian et Lucas, 1988; Maathuis et Sanders, 1993). Le développement des connaissances concernant les protéines responsables des transports de K<sup>+</sup> dans la plante conduit maintenant à considérer que cette vision est très simplificatrice.

### **1.3 Des canaux et des transporteurs participent aux transports de K<sup>+</sup> chez les plantes**

L'analyse moléculaire des mécanismes de transport de K<sup>+</sup> a révélé la présence de canaux et de transporteurs. La distinction entre canal et transporteur est fondée sur le mécanisme de transport. Un canal, après s'être "ouvert" à la suite d'un changement conformationnel, permet le passage d'un flux d'ions à travers son pore sans qu'aucun de ces ions n'interagisse fortement avec un site de liaison (selon le schéma enzymatique classique : enzyme + substrat → enzyme-substrat décrit par la loi d'action de masse), et sans que la traversée d'un ion n'indue un autre changement conformationnel. Au contraire, un transporteur est défini comme une protéine "fixant" son substrat présent d'un côté de la membrane (selon un processus qui peut être décrit par la loi d'action de masse), puis transférant ce substrat sur l'autre face de la membrane *via* un changement conformationnel, pour chaque molécule de substrat transportée (Stein, 1990). Cette différence de fonctionnement a plusieurs conséquences. L'absence de changement conformationnel à chaque événement de transport fait que le flux d'ions est nettement plus rapide dans le cas d'un canal que dans celui d'un transporteur (respectivement environ 10<sup>6</sup> et 10<sup>3</sup> événements de transport par seconde et par

protéine à saturation (Stein, 1990)). En revanche, en absence de changements conformationnels à chaque événement de transport, le canal ne peut transférer d'énergie à l'ion transporté. Le mode de fonctionnement du transporteur peut permettre un tel transfert et donc "énergiser" le transport contre le gradient de potentiel électrochimique, c'est-à-dire autoriser un transport actif. Par contre, les particularités de fonctionnement des transporteurs par rapport aux canaux ne se traduisent pas obligatoirement par une plus grande sélectivité ionique (les canaux peuvent être plus sélectifs que les transporteurs) ou par une affinité supérieure ( $K_m$  inférieur)<sup>1</sup>.

Les paragraphes suivants présentent un résumé des connaissances concernant les transporteurs de  $K^+$  (§ 1.4) et les canaux potassiques (§ 1.5 et 1.6) identifiés chez les plantes.

## 1.4 Les transporteurs de $K^+$

Les transporteurs de  $K^+$  sont à l'heure actuelle classés en deux groupes, KUP (pour  $K^+$  Uptake) et HKT (pour High affinity  $K^+$  Transporter), dont les caractéristiques sont détaillées ci-dessous.

### 1.4.1 La famille KUP

Les membres de cette famille sont apparentés à des transporteurs initialement identifiés chez la bactérie *E. coli* (Kup, Kdp; Hesse *et al.*, 1984; Schleyer et Bakker, 1993) et la levure *S. occidentalis* (SoHAK; Banuelos *et al.*, 1995). Ils présentent tous 12 segments transmembranaires, avec certaines régions bien conservées. Les premiers transporteurs de ce type identifiés chez les plantes ont été clonés chez l'orge. Des expériences de RT-PCR, menées avec des amorces correspondant à ces régions conservées sur des ARN de racines d'orge, ont abouti au clonage de deux transporteurs : HvHAK1 et HvHAK2. Ces protéines présentent des similarités (environ 25% de résidus identiques) avec les transporteurs Kup et SoHAK (Santa-Maria *et al.*, 1997).

---

<sup>1</sup> De plus, en absence d'interaction forte du canal avec l'ion transporté, la loi d'action de masse ne peut être utilisée pour rendre compte de la complexité de l'interaction. La description du processus de transport par le formalisme de Michaelis-Menten, conduisant à la définition du  $K_m$ , ne peut donc avoir qu'un intérêt opérationnel. Il faut aussi noter, dans le cas d'un canal comme dans celui d'un transporteur, que l'allure hyperbolique de la cinétique de transport témoigne de la saturation d'un processus impliqué dans le transport lorsque la concentration du soluté augmente, mais ne permet pas d'affirmer que cette saturation concerne le site de fixation du substrat. En effet, on peut imaginer par exemple que l'augmentation du flux avec la concentration se traduit par une variation de la polarisation électrique de la membrane, diminuant progressivement le gradient de potentiel électrochimique responsable du flux, jusqu'à l'annuler. Autrement dit, la signification du paramètre  $K_m$  n'est pas univoque. Il peut donc être trompeur de comparer, à travers ce paramètre, des transporteurs caractérisés *in situ* chez différents organismes ou en système hétérologue.

Des ADNc d'*Arabidopsis* ont ensuite été clonés *in silico*, sur la base de similarités de séquence avec les gènes *HvHAK* (Quintero et Blatt, 1997; Kim *et al.*, 1998), ou par complémentation fonctionnelle de mutants de levure (Fu et Luan, 1998). Ils ont été nommés AtKUP (parfois AtKT), et présentent de fortes similarités avec les protéines HvHAK d'orge. Les gènes *AtKUP* sont au nombre de 11 chez *Arabidopsis* à l'heure actuelle, et un orthologue d'*AtKUP4* a été identifié chez le riz.

L'accumulation des ARNm *AtKUP1* dans la plante (*Arabidopsis*) dépend des conditions environnementales (en particulier de la concentration de K<sup>+</sup> et du pH de la solution nutritive), mais les données dans ce domaine sont contradictoires (Quintero et Blatt, 1997; Fu et Luan, 1998; Kim *et al.*, 1998). L'expression d'*AtKUP1* provoque une augmentation du flux de <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> chez la levure *S. cerevisiae* (Fu et Luan, 1998), *E. coli* et les cellules d'*Arabidopsis* en culture (Kim *et al.*, 1998). Le transport est inhibé par la présence de Na<sup>+</sup> dans le milieu (Quintero et Blatt, 1997). La relation entre la vitesse du transport de K<sup>+</sup> (tracé par <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>) et la concentration extérieure de cet ion est complexe. L'allure biphasique de la cinétique, avec une composante hyperbolique dans le domaine des faibles concentrations et une seconde composante dans le domaine des fortes concentrations, a été interprétée comme la traduction de deux modes de fonctionnement possible du transporteur, le premier avec un K<sub>M</sub> estimé à 22 μmol.l<sup>-1</sup> dans les cellules d'*Arabidopsis* en culture (Kim *et al.*, 1998) et à 44 μmol.l<sup>-1</sup> dans la levure (Fu et Luan, 1998) (voir la note, page précédente), et le second avec un K<sub>M</sub> de 11 mmol.l<sup>-1</sup> (dans la levure; Fu et Luan, 1998). Autrement dit, les caractéristiques d'*AtKUP1* pourraient, à elles seules, rendre compte de la cinétique biphasique du transport de K<sup>+</sup> par les tissus végétaux, analysée selon le modèle d'Epstein (1963).

#### 1.4.2 La famille HKT

*HKT1* est un ADNc de blé qui a été cloné par complémentation fonctionnelle d'une souche de levure mutante, déficiente pour le transport de K<sup>+</sup> (Schachtman et Schroeder, 1994). La séquence protéique d'*HKT1* rappelle celle de TRK1, un transporteur cloné chez *S. cerevisiae*, avec environ 19 % d'identité dans certains des 10 ou 12 segments transmembranaires potentiels.

L'expression de *HKT1* dans l'ovocyte de xénophage provoque un courant entrant en présence de K<sup>+</sup>, mais aussi d'autres cations. L'intensité de ce courant augmente avec la diminution du pH extérieur. Cela a initialement conduit à l'hypothèse d'un fonctionnement de type symport H<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> (Schachtman et Schroeder, 1994). Des analyses ultérieures ont révélé une sensibilité du transport à la présence de Na<sup>+</sup> dans le milieu, qui a été prise comme l'indice d'un symport Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup>. Il semblerait que ce système fonctionne comme un symport Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> à forte affinité pour K<sup>+</sup> (ca. 10 μM) lorsque la concentration externe de Na<sup>+</sup> est faible (< 1 mM), et comme un transporteur de Na<sup>+</sup> à faible affinité (K<sub>M</sub> voisin de 5 mM) lorsque la

concentration de cet ion est plus élevée, le transport de K<sup>+</sup> étant alors bloqué (Rubio *et al.*, 1995; Gassmann *et al.*, 1996).

Un orthologue du gène HKT1 a été identifié chez *Arabidopsis* (Uozomi *et al.*, 2000). Le polypeptide codé par ce gène (*AtHKT1*) présente 41 % d'identité avec HKT1. Il est exprimé majoritairement dans les racines. Ses caractéristiques fonctionnelles diffèrent de celles de HKT1. Il se comporte en système hétérologue comme un transporteur sélectif de Na<sup>+</sup>, peu affecté par la présence de K<sup>+</sup>. Il est insensible à l'acidification du milieu extérieur. Il ne complémentise pas des levures *S. cerevisiae* déficientes pour le transport de K<sup>+</sup>, mais complémentise des bactéries présentant le même type de déficience. La complémentation chez *E. coli* ne traduit cependant pas une forte augmentation de l'influx de K<sup>+</sup>: la vitesse du transport n'est augmentée que d'un facteur 2 environ. Dans ce contexte, il a été suggéré que l'activité de transport de K<sup>+</sup> ne serait pas la fonction essentielle de AtHKT1 (Uozomi *et al.*, 2000).

## 1.5 Les canaux potassiques de type Shaker

Les premiers canaux potassiques végétaux de type Shaker ont été identifiés en 1992, chez *Arabidopsis thaliana* (Anderson *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992). Des canaux animaux de ce type avaient été identifiés 5 ans plus tôt, chez la drosophile (Shih et Goldin, 1987).

### 1.5.1 Les canaux Shaker animaux

Le clonage du premier canal potassique animal a été réalisé grâce à l'étude des mutants Shaker de drosophile. Ces mutants, soumis à une anesthésie, présentent des mouvements saccadés des ailes, des pattes et de l'abdomen (Kaplan et Trout, 1969). Le gène muté à l'origine de ce phénotype a été identifié par marche sur le chromosome (Papazian *et al.*, 1987). L'analyse de la séquence polypeptidique correspondante révéla des similarités de structure et de séquence avec des canaux sodiques et calciques animaux précédemment clonés. Des expériences d'expression dans l'ovocyte de xénope permirent rapidement de mettre en évidence une activité de type canal potassique rectifiant sortant<sup>1</sup>, régulée par le voltage et activée par la dépolarisation.

<sup>1</sup> Le qualificatif rectifiant signifie que le canal ne laisse passer le courant (*i.e.* le flux d'ions) que dans un sens (par analogie avec le terme de rectification employé pour décrire l'effet d'une diode sur la circulation du courant dans un circuit électrique). Un canal potassique rectifiant entrant est un canal qui favorise le passage des ions dans le sens de l'entrée dans la cellule. Différents mécanismes peuvent être à l'origine de la "rectification" du canal. Par exemple, il existe des canaux potassiques de type rectifiant entrant dont la rectification provient d'un blocage du pore par Mg<sup>2+</sup>. Lorsque le pore d'un canal de ce type est ouvert, il autorise un influx de K<sup>+</sup> si le gradient de potentiel électrochimique de cet ion est en faveur de l'influx. Si ce gradient est en faveur de la sortie de K<sup>+</sup>, un efflux est observé pendant un très bref instant, jusqu'à ce qu'un ion Mg<sup>2+</sup> du cytoplasme s'introduise

Le polypeptide Shaker présente un domaine hydrophobe caractéristique, constitué de 6 segments transmembranaires, appelés S1 à S6, les extrémités N- et C-terminales étant cytoplasmiques (Shih et Goldin, 1997). Parmi ces segments, S4 présente des résidus chargés positivement (R ou K), espacés régulièrement. Cette propriété lui confère le rôle de senseur de potentiel du canal (Papazian *et al.*, 1991). De façon simplifiée, un déplacement de S4 dans le sens perpendiculaire au plan de la membrane, en réponse à une variation de potentiel électrique transmembranaire, provoque le changement conformationnel à l'origine de l'ouverture du canal. Le polypeptide Shaker présente un autre domaine remarquable, situé entre S5 et S6 et appelé P, pour pore. Ce domaine est partiellement membranaire. Il très conservé parmi les divers canaux et espèces. Il forme le pore du canal, contrôlant ainsi la perméation des ions et la sélectivité ionique. Le canal Shaker est fonctionnel sous forme tétramérique. Quatre sous-unités s'assemblent dans la membrane, de telle sorte que les 4 segments P soient contigus et forment un pore fonctionnel.

Le criblage à basse stringence de banques d'ADN de drosophile, à l'aide de sondes correspondant au gène *Shaker*, a rapidement conduit au clonage de 3 gènes apparentés, appelés *Shal*, *Shab* et *Shaw* (Butler *et al.*, 1989). Les protéines correspondantes sont dotées globalement des mêmes caractéristiques que le canal Shaker. Avec la protéine Shaker, elles définissent 4 sous-familles de canaux potassiques animaux de type Shaker. Les criblages hétérologues de banques réalisés avec les sondes correspondantes ont permis d'identifier de nombreux canaux de type Shaker chez les mammifères (Rudy, 1988). On distingue actuellement 9 sous-familles, appelées dans une nouvelle nomenclature Kv1 à Kv9 (K pour  $K^+$ , et v pour indiquer que les canaux de ce type sont régulés par le voltage), au sein de la famille Shaker (Kv1 correspond à la sous-famille Shaker *sensu stricto*).

### 1.5.2 Les canaux Shaker d'*Arabidopsis*

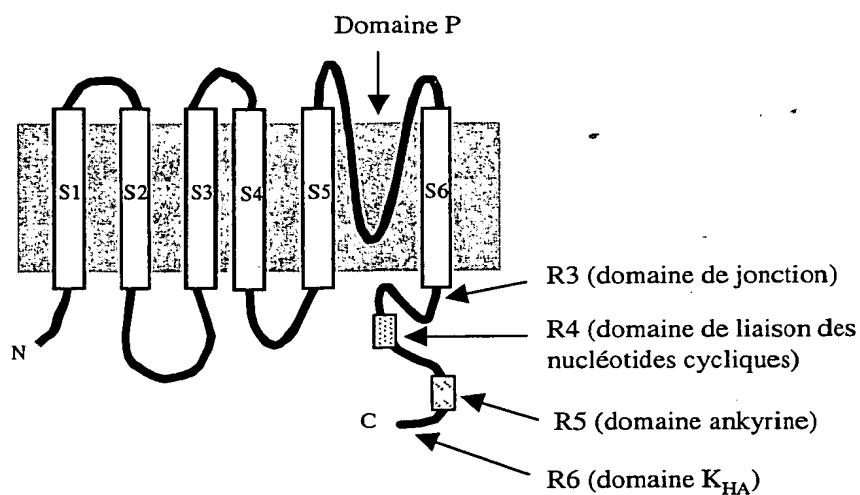
#### *Clonage des canaux*

Les premiers canaux potassiques de plantes ont été découverts en 1992. Les ADNc correspondants ont été clonés par criblage fonctionnel dans la levure : des banques d'ADNc d'*Arabidopsis* ont été utilisées pour complémenter une souche de levure *S. cerevisiae* déficiente pour l'absorption du potassium. Deux clones ont été ainsi identifiés : *KAT1* (pour  $K^+$  *Arabidopsis Transporter*) et *AKT1* (pour *Arabidopsis K<sup>+</sup> Transport system*) (Anderson *et al.*,

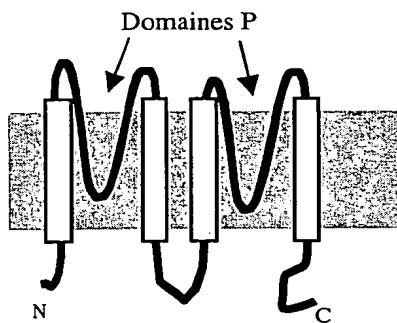
---

dans le pôle et le bloque. Autrement dit, ce type de "rectification" n'est pas le résultat d'une propriété intrinsèque de la protéine mais résulte d'un blocage du flux sortant par les ions  $Mg^{2+}$  cytoplasmiques (en absence de  $Mg^{2+}$ , il n'y a plus de rectification). Un autre mécanisme de rectification est la sensibilité au voltage : le canal s'ouvre en réponse à une variation du potentiel électrique transmembranairé (qui provoque un changement conformationnel du canal). Cette sensibilité au voltage fait que le canal est ouvert dans une gamme de potentiels qui détermine le sens du gradient transmembranaire de potentiel électrochimique de  $K^+$ , et donc le sens du flux à travers le canal.

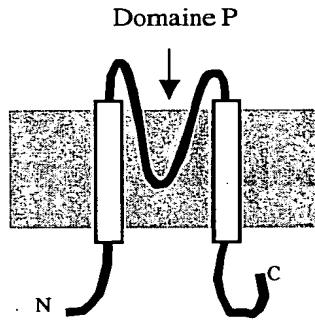
### Shaker



### KCO (TWIK)



### KCO3 (Kir)



### cNGC

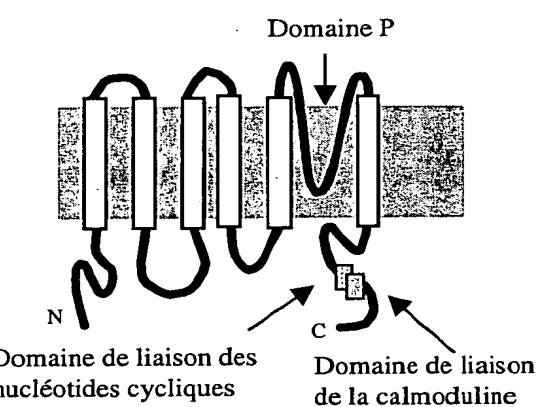


Figure 1.1 : les types de canaux potassiques clonés chez *Arabidopsis*.

Trois familles de canaux présentant des homologies avec les canaux potassiques animaux ont été identifiés chez *Arabidopsis*.

La famille des canaux Shaker végétaux comporte 9 protéines. Ces canaux présentent six segments transmembranaires (S1 à S6), le domaine P étant situé entre S5 et S6. La longue partie C-terminale est constituée du domaine de jonction, puis du domaine de liaison des nucléotides cycliques. Le domaine ankyrine n'est pas présent chez tous les canaux : KAT1, KAT2 et AtKC1 en sont dépourvus. Enfin, le domaine  $K_{HA}$ , à l'extrémité C-terminale, est riche en acides aminés acides et hydrophobes.

La famille KCO regroupe des protéines présentant des homologies avec les canaux animaux de type TWIK. Ces canaux possèdent 4 segments transmembranaires et deux domaines P impliqués dans la formation du pore. Le canal KCO3 est particulier : il présente des homologies avec les canaux Kir, et ne possède que deux domaines transmembranaires et un seul domaine P.

Les canaux de la famille cNGC sont des canaux régulés par les nucléotides cycliques comme les canaux Shaker, et sont capables de fixer la calmoduline. Ils possèdent 6 segments transmembranaires et un domaine P. Leur domaine cytoplasmique contient un domaine de liaison des nucléotides cycliques, et un domaine de fixation de la calmoduline. Ces canaux ne sont probablement pas spécifiques de  $K^+$  (pas de GYGD dans le pore).

Pour toutes les familles, se rapporter au texte pour les détails.

Le polypeptide Shaker présente un domaine hydrophobe caractéristique, constitué de 6 segments transmembranaires, appelés S1 à S6, les extrémités N- et C-terminales étant cytoplasmiques (Shih et Goldin, 1997). Parmi ces segments, S4 présente des résidus chargés positivement (R ou K), espacés régulièrement. Cette propriété lui confère le rôle de senseur de potentiel du canal (Papazian *et al.*, 1991). De façon simplifiée, un déplacement de S4 dans le sens perpendiculaire au plan de la membrane, en réponse à une variation de potentiel électrique transmembranaire, provoque le changement conformationnel à l'origine de l'ouverture du canal. Le polypeptide Shaker présente un autre domaine remarquable, situé entre S5 et S6 et appelé P, pour pore. Ce domaine est partiellement membranaire. Il très conservé parmi les divers canaux et espèces. Il forme le pore du canal, contrôlant ainsi la perméation des ions et la sélectivité ionique. Le canal Shaker est fonctionnel sous forme tétramérique. Quatre sous-unités s'assemblent dans la membrane, de telle sorte que les 4 segments P soient contigus et forment un pore fonctionnel.

Le criblage à basse stringence de banques d'ADN de drosophile, à l'aide de sondes correspondant au gène *Shaker*, a rapidement conduit au clonage de 3 gènes apparentés, appelés *Shal*, *Shab* et *Shaw* (Butler *et al.*, 1989). Les protéines correspondantes sont dotées globalement des mêmes caractéristiques que le canal Shaker. Avec la protéine Shaker, elles définissent 4 sous-familles de canaux potassiques animaux de type Shaker. Les criblages hétérologues de banques réalisés avec les sondes correspondantes ont permis d'identifier de nombreux canaux de type Shaker chez les mammifères (Rudy, 1988). On distingue actuellement 9 sous-familles, appelées dans une nouvelle nomenclature Kv1 à Kv9 (K pour  $K^+$ , et v pour indiquer que les canaux de ce type sont régulés par le voltage), au sein de la famille Shaker (Kv1 correspond à la sous-famille Shaker *sensu stricto*).

### 1.5.2 Les canaux Shaker d'*Arabidopsis*

#### *Clonage des canaux*

Les premiers canaux potassiques de plantes ont été découverts en 1992. Les ADNc correspondants ont été clonés par criblage fonctionnel dans la levure : des banques d'ADNc d'*Arabidopsis* ont été utilisées pour complémenter une souche de levure *S. cerevisiae* déficiente pour l'absorption du potassium. Deux clones ont été ainsi identifiés : *KAT1* (pour  $K^+$  *Arabidopsis Transporter*) et *AKT1* (pour *Arabidopsis K<sup>+</sup> Transport system*) (Anderson *et al.*,

---

dans le pôle et le bloque. Autrement dit, ce type de "rectification" n'est pas le résultat d'une propriété intrinsèque de la protéine mais résulte d'un blocage du flux sortant par les ions  $Mg^{2+}$  cytoplasmiques (en absence de  $Mg^{2+}$ , il n'y a plus de rectification). Un autre mécanisme de rectification est la sensibilité au voltage : le canal s'ouvre en réponse à une variation du potentiel électrique transmembranaire (qui provoque un changement conformationnel du canal). Cette sensibilité au voltage fait que le canal est ouvert dans une gamme de potentiels qui détermine le sens du gradient transmembranaire de potentiel électrochimique de  $K^+$ , et donc le sens du flux à travers le canal.

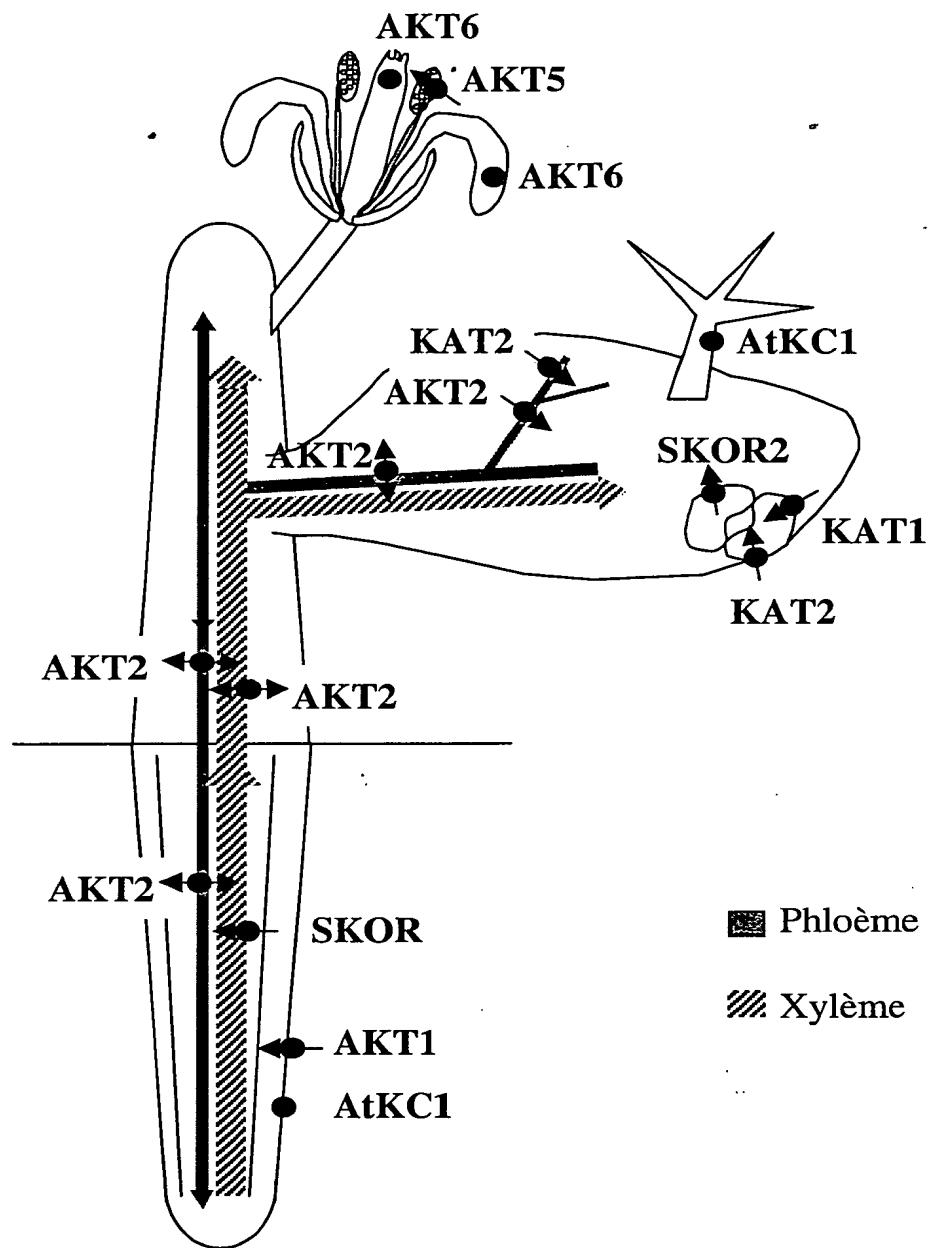


Figure 1.2 : schéma récapitulatif de la localisation de l'expression et des propriétés fonctionnelles des canaux  $K^+$  d'*Arabidopsis*.  $K^+$  est absorbé par la racine grâce au canal entrant AKT1. Compte tenu de sa localisation, AtKC1 pourrait aussi intervenir dans ce processus.  $K^+$  est ensuite sécrété dans l'apoplasm stélaire à travers le canal sortant SKOR. Il est alors dirigé vers les feuilles par le flux de sève xylémienne. Déchargé dans l'apoplasm foliaire, il est soit absorbé par les cellules du mésophylle ou de l'épiderme, soit redirigé vers d'autres organes via le flux de sève phloémienne. Sa décharge dans les tissus phloémiens ferait intervenir le canal AKT2. KAT2 pourrait également participer à cette fonction. Au niveau de la tige, le canal AKT2 interviendrait dans les échanges de  $K^+$  entre le xylème et le phloème, tandis que dans les organes puits (racines) il permettrait la décharge du phloème en  $K^+$ . L'ouverture du stomate serait permise par l'intervention des canaux entrants KAT1 et KAT2, et la fermeture du stomate mettrait en jeu l'ouverture du canal sortant SKOR2. Le canal entrant AKT5 semble impliqué dans la germination du grain de pollen. Le rôle des canaux AKT6 dans les organes reproducteurs et AtKC1 dans les trichomes est encore inconnu (d'après Pilot, 1999; détails et références : voir le texte).

1992; Sentenac *et al.*, 1992). L'analyse des séquences protéiques correspondantes révèle un pourcentage d'identité significatif avec la séquence du canal Shaker. Le profil d'hydrophobicité des polypeptides AKT1 et KAT1 suggère qu'ils possèdent eux aussi le domaine hydrophobe caractéristique des canaux animaux de la famille Shaker, avec ses 6 segments transmembranaires (figure 1.1). Par analogie, ces segments ont aussi été nommés S1 à S6.

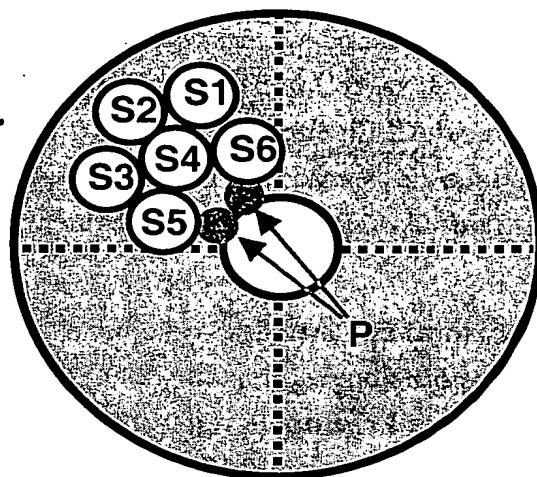
KAT1 et AKT1 ont été exprimés dans des systèmes hétérologues se prêtant aux analyses fonctionnelles électrophysiologiques. Ce sont des canaux de type rectifiant entrant, régulés par le voltage, et activés par l'hyperpolarisation (KAT1 : Schachtman *et al.*, 1992; Cao *et al.*, 1995; Hedrich *et al.*, 1995; Hoshi *et al.*, 1995; AKT1 : Gaymard *et al.*, 1996).

Le profil d'expression de *KAT1* et *AKT1* a été analysé par northern blot et via l'utilisation du gène rapporteur *GUS*. L'expression de KAT1 est détectée essentiellement dans les cellules de garde (figure 1.2; Nakamura *et al.*, 1995). AKT1 est exprimé dans les tissus périphériques de la racine mature (épiderme et cortex) (figure 1.2) ainsi que dans les hydathodes (structure foliaire impliquée dans le processus de gutation) et dans les stipules (Basset *et al.*, 1995; Lagarde *et al.*, 1996; Pilot, 1999).

Des criblages à basse stringence de banques d'ADNc ont permis d'identifier d'autres membres de la famille Shaker chez *Arabidopsis*, correspondant aux canaux KAT2 (Butt *et al.*, 1997), AtKC1 (Sallbach; séquence également disponible dans les banques sous le nom d'AKT4 [AC n°Z83202]), et AKT2/3 (Cao *et al.*, 1995; Ketchum et Slayman, 1996). AKT2 et AKT3 correspondent au même gène, mais ils diffèrent par les sites d'initiation de la transcription et de la traduction retenus par les auteurs. Il y sera fait référence par le nom d'AKT2 dans la suite de ce chapitre. Les séquences primaires des polypeptides KAT2 et KAT1 (Pilot, 1999) sont très similaires et les deux canaux sont dotés de caractéristiques fonctionnelles proches (Lacombe, 2000). Comme KAT1, KAT2 est exprimé dans la cellule de garde (Pilot, 1999) (figure 1.2). Le canal AKT2 présente une faible rectification entrante. Il est exprimé dans les tissus phloémiens, à la fois dans les organes sources et dans les organes puits (figure 1.2). En relation avec ce profil d'expression et sa faible rectification, AKT2 pourrait être impliqué à la fois dans la charge et dans la décharge du phloème en K<sup>+</sup> (Lacombe *et al.*, 2000). Les caractéristiques fonctionnelles d'AtKC1 n'ont pas pu être déterminées. Son profil d'expression est proche de celui d'AKT1 : hydathodes, trichomes, stipules, cellules de l'épiderme et du cortex racinaire (Pilot, 1999) (figure 1.2).

Les ADNc des autres canaux d'*Arabidopsis* connus à ce jour ont été clonés *in silico*. L'ADNc codant le canal SKOR a été identifié par le programme de séquençage systématique d'EST. SKOR est un canal à rectification sortante, exprimé dans le péricycle et le parenchyme vasculaire racinaire (figure 1.2). La caractérisation d'un mutant knock-out pour ce canal a révélé un rôle dans la sécrétion de K<sup>+</sup> dans la sève xylémienne (Gaymard *et al.*, 1998). Le

A



B

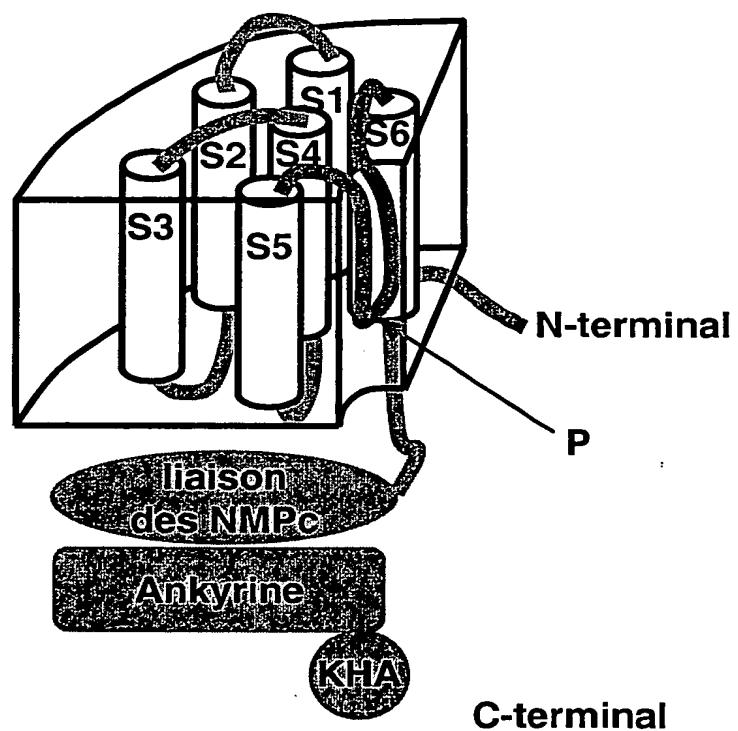


Figure 1.3 : structure tétramérique des canaux de type Shaker.

- A. Vue en coupe transversale de l'organisation tétramérique proposée pour les canaux Shaker. Les six segments transmembranaires sont insérés dans la membrane de façon à ce que les 4 segments P soient contigus au centre de la structure et forment le pore à travers lequel passent les ions K<sup>+</sup>.
- B. Implantation des 6 segments transmembranaires d'un monomère dans la membrane et disposition de la partie C-terminale sous-jacente.

séquençage du génome d'*Arabidopsis* a révélé la présence de trois autres gènes, appelés AKT5 (AC006053), AKT6 (AL034567), tous deux très ressemblants à AKT1, et SKOR2 (AB025630), similaire à SKOR et possédant lui aussi une rectification sortante (Benoît Lacombe, résultats non publiés). A ce jour, nous ne disposons que de peu de données sur ces canaux (localisation de l'expression : Cf. figure 1.2).

La majorité des gènes codant les canaux précédemment cités sont maintenant séquencés dans le cadre du programme de séquençage du génome d'*Arabidopsis*. Les gènes codant les canaux AKT1 (Basset *et al.*, 1995), AKT2 (Cao *et al.*, 1995; Ketchum et Slayman, 1996), SKOR (Gaymard *et al.*, 1998), et KAT1 (Nakamura *et al.*, 1995) avaient auparavant été séquencés après leur clonage à partir de banques d'ADN génomique.

En conclusion, les canaux de type Shaker sont au nombre de 9 chez *Arabidopsis* à l'heure actuelle. Le génome étant presque entièrement séquencé, la probabilité de découvrir un autre membre dans cette famille est faible, et l'on peut considérer que la famille est probablement complète.

### **Structure protéique**

Les canaux de type Shaker sont fonctionnels lorsque 4 monomères sont assemblés (figure 1.3), ménageant un pore au centre des 4 sous-unités. En système hétérologue, l'assemblage peut associer 4 sous-unités identiques (homotétramérisation) ou différentes (hétérotétramérisation) (Dreyer *et al.*, 1997).

Les analyses de séquence conduisent à distinguer six grandes régions, appelées ci-dessous R1 à R6, dans les canaux Shaker végétaux (figure 1.1).

La région N-terminale, ou R1, est la partie cytoplasmique précédant le premier segment transmembranaire (S1). Cette région est relativement peu conservée entre les différents canaux, et sa longueur est très variable (de 16 à 91 résidus).

La région transmembranaire (R2), constitue le cœur hydrophobe du canal. Elle comporte les 6 segments transmembranaires et le domaine P entre S5 et S6, caractéristiques des canaux Shaker. S4, le senseur de voltage, possède en particulier 7 résidus basiques (H, R, K), et deux résidus acides (D, E), conservés chez les 9 canaux (figure 1.4). Les séquences de R2 les plus conservées sont celles des segments P et S6. En particulier, tous les segments P des canaux Shaker identifiés à ce jour comportent le motif GYGD, qui constitue la "signature" la plus caractéristique des canaux sélectifs de K<sup>+</sup> (figure 1.4). La longueur du domaine R2 est relativement conservée, comprise entre 232 et 242 résidus. Les différences entre les canaux se situent principalement dans les boucles séparant les segments transmembranaires.

La région suivante est appelée domaine de jonction, ou R3. Des tests en double-hybride dans la levure suggèrent une interaction de ce domaine avec l'extrémité C-terminale du

R1

		M R G G A L L C G Q V Q D E I E Q L S R E S	22
AKT1	1	M E K K K V W F W G V K D D G E G G G G R G G G R T K D A E D D V A D H L S R D G T M	43
AKT5	1	M G I E K R K K M V W F W P E K H E G G V I K E A E D V A A E H I S R E G T M	39
AKT6	1	M D L K Y S A S H C N L S S D M K L R R F H Q H R G K G R E E E Y D A S S L	38
AKT2	1	M S T T T T E A R S P L P L L L R R G R S S T A L S A S T A E A R S P L S I L Q F R R R S S K D V R	57
AtKC1	1	M S T T T T E A R S P L P L L L R R G R S S T A L S A S T A E A R S P L S I L Q F R R R S S K D V R	43
SKOR	1	M G G S S G G G V S Y R S G G R S D V E L E D Y E V D D F R D G I V E S R G N R F N P	
SKOR2		M M N D W F	6
SOR	1	M S I S C T R N F F E R F C V E E Y N I D T I K Q	25
KAT1	1	M L K R K H L N T R P M S I S C T R N F F K R F C V E E Y N M D T F K H	36
KAT2	1	M S F S C A K A F F Q R F C V E E F Q M E R T S L	25
SIRK	1		
		1      2	
AKT1	23	S H F S L S T G I L P S L G A R S N R R V K L R R - - - F V V S P Y D H K Y R I W E A	62
AKT5	44	S Q Y S L S K G L L P S L G A N N - - R S S R D V I L P R F I V S P F D P R Y R A W E T	85
AKT6	40	S H Y S F S K G L L P P L G V G A T A R S S R H I K L R C F I V S P F D P R Y R A W D W	83
AKT2	39	S L N N L S K L I L P P L G V A S Y N Q N H I R S S G - - W I I S P M D S R Y R C W E F	80
AtKC1	58	N I T S V S S S L L P A F G T F I E D D N P S S K P - - - F I V L H F D R R Y R L W E L	91
SKOR	44	L T N F L G L D F A G G S G G K F T V I N G I R D I S R G S I V H P D N R W Y K A W T M	87
SKOR2	1	M K S E K K L I R W Y K A W E M	16
SOR	7	S V S P I P T R Q N S H N A S T N E I F L G T R H E R Q K G R I E P D G R W Y R T W T K	51
KAT1	26	S S - F L S A D L L P S L G A R I N Q S T K L R K - - - H I I S P F N P R Y R A W E M	64
KAT2	37	S S - F L S A D L L P S L G A R I N Q S T K L R K - - - H I I S P F D P R F R G W E M	75
SIRK	26	G S V F - S S H L L P S L G A R I N Q A T K L Q K - - - H I I S P F D P R Y R A W E M	60

R2

		S1		
AKT1	63	F L V V L V V Y T A W V S P F E F G F L R K P R P - - P L S I T D N I V N A F F A I D I I M T F F V G	111	
AKT5	86	F L V F L V L Y T A W A S P F E F G F L Q K P R P - - P L S I L D N I V N G F F A V D I V L T F F V A	134	
AKT6	84	F L V I L V L Y T A W A S P F E F G F L Q T P R A - - P L S I L D N V V N G F F A V D I V L T F F V A	132	
AKT2	81	Y M V I L L V A Y S A W V Y P F E V A F L N S S P K R N L C I A D N I V D L F F A V D I V L T F F V S	130	
AtKC1	92	F L V I L V G Y S A W A S L F E L A F E K A A E G - - A L L T H D L V D F F F A V D I I L T F F V S	140	
SKOR	88	F I L I W A I L Y S S F F P L E F G G F R G L P E - - N L F I L D I A G Q I A F L V D I V L T F F V A	136	
SKOR2	17	F I L V W A I L Y S S L F T P M E F G G F R G L P E - - R L F V D I V G Q I A F L V D I V L Q F F V A	65	
SOR	52	F I L L W A V Y S S F T P M E F G G F R G L P E - - D L V F L D I A G Q I A F L D I V L R F F I A	100	
KAT1	65	W L V L V I V I Y S A W I C P F Q F A F I T Y K K D - - A L F I I D N I V N G F F A I D I I I L T F F V A	113	
KAT2	76	W L V I L V I V I Y S A W I C P F E F A F I T Y K K D - - A L F I I D N I V N G F F A I D I I I L T F F V A	124	
SIRK	61	L L I I L V I V I Y S A W I C P F E F G F L P Y K Q D - - A L F I F D N I V N G F F A I D I V L T F F V A	108	
		S3		
AKT1	112	Y L D K S T Y L I V D D R K Q I A F K Y L R S - - W F E L D E V S T I P S E A A M R I S S Q - - -	155	
AKT5	135	F L D K V T Y L L V D D P K R I A W R Y A S T - - W L I F D V V S T F P Y E I F G S L L H E S I Q - -	181	
AKT6	133	F L D K A T Y L L V D D P K R I A W R Y T S T - - W L I F D V V S T V P Y E I F G S L L H N T I Q - -	179	
AKT2	131	Y I D E R T Q L L V R E P K Q I A R Y L S T - - W F L I M D V A S T I P F D A I G Y L I T G T S T L N	179	
AtKC1	141	Y L D N T T Y L N V T D H K L I A K R Y L K S V A F V M D V A S T L P I Q F I Y K T I T G D V G R G	190	
SKOR	137	Y R D S R T Y R M I Y K R S S I A R Y L K S - - T F I I D L L A C M P W D I I Y K A A G E K - - -	181	
SKOR2	66	Y R D T Q T Y R T V Y K P T R I A F R Y L K S - - H F L I M D F I G C F P W D L I Y K A S G K H - - -	110	
SOR	101	Y R D A H T Y R M V Y K R T S I A L R Y M K S - - S F V I D E L I C C L P W D I I Y K A C G R K - - -	144	
KAT1	114	Y L D S H S Y L L V D S P K K I A I R Y L S T - - W F A F D V C S T A P F Q P S L L F N Y N - G S E	161	
KAT2	125	Y L D S H S Y L L V D K P K K I A I R Y L S T - - W F A F D V C S T A P F Q S L S L L F K Y N - G S E	172	
SIRK	109	Y L D T E T Y L L V D D A K K I A I R Y I S T - - W F I F D V C S T A P F E Z A F S L L F T K H - N S G	155	
		S4		
AKT1	156	- S Y G I F N M L R L W R L R R V G A L F A R L E K D R N F N Y F W V R C A K L V C V T L F A V H C	204	
AKT5	182	- G Y G I F S M L R L W R L R R V S N C F A R L E K D R K Y S Y F W V R C S K L L L V T L F V H C	230	
AKT6	180	- G Y G I F S M L R L W R L H R V S F C F A R L E K D R K Y N Y F W I R C F R L L S V T L F L V H C	228	
AKT2	180	I T C N L L G L L R F W R L R R V K H L F T R L E K D I R Y S Y F W I R C F R L L S V T L F L V H C	229	
AtKC1	191	Q A F G F L N I L R L W R L R R V A H E K L F T R L E K D R K Y N Y F W I R C F R L L S V T L F L V H C	240	
SKOR	182	E E V R Y L L I R I L Y R V H R V I L F F H K M E K D I R I N Y L E T R I V K L I F V E L Y C T H T	231	
SKOR2	111	E L V R Y L L W R L R F E K V V E F F O R L E K D T R I N Y L E T R I L K L L F V E V Y C T H T	160	
SOR	145	E E V R Y L L W R L R F I R V C K V T D F F Q N L E K D T R I N Y M E T R I L K L I A V E L Y C T H T	193	
KAT1	162	L G F R I L S M L R L W R L R R V S S L F A R L E K D I R F N Y F W I R C T K L I S V T L F A V H C	211	
KAT2	173	I G F R V L S M L R L W R L R R V S S L F A R L E K D I R F N Y F W I R C I K L T S V T L F A V H C	222	
SIRK	156	L G Y R A L N M L R L W R L R R V S S L F A R L E K D I R F N Y F W I R C I K L T S V T L F A V H C	204	
		S5		

AKT1	205	AAC F Y Y L I A A R N S N - P A K T W I G A N - - - V A N F L E E S L W M R Y V T S M Y W	246
AKT5	231	G A C F L Y S I A A H Y P D - P S K T F E M A L T - - - D E N W K E S P I A V R Y N T A M Y W	272
AKT6	229	G A C F C Y S I A A H Y P D - P S M T F E M A L A - - - E A N W K Q K S L L I R Y V T A M Y W	270
AKT2	230	G G C S Y Y L I A D R Y P H - - Q G K T W T D A T - - - P N F T E T S L S I R Y I A A I Y W	270
AtKC1	241	G G C I L Y W I A Y H Y P R - P T D T W I G S Q - - - V E D F K E R S V W L G Y T Y S M Y W	282
SKOR	232	A A C I F Y Y L I A T T L P A S Q E G Y T W I G S K L G D Y S Y S K F R E I D L W T R Y T T S M Y W	281
SKOR2	161	A A C I F Y Y L I A T T L P P E N E G Y T W I G S K L G D Y S Y E N F R E I D L W K R Y T T A L Y W	210
SOR	194	A A C V F Y Y L I A T T L P Q S E E G Y T W I G S K L G D Y S Y S H F R E I D L W K R Y T T S Y W	242
KAT1	212	A G C F N Y L I A D R Y P N - P R K T W I G A V - - - Y P P N F K E A S L W N R Y V T A L Y W	253
KAT2	223	A G C F A Y L I A D Q Y H D - P T K T W I G A V - - - Y P P N F K E T S V W S R Y V T A L Y W	264
SIRK	205	A G C F N Y L I A D R Y P D - P E R T W I G A V - - - Y P P N F K E E N L W D R Y V T S Y W	245

	P	7	S	6	
AKT1	247	S I T T L T T V G Y G D L H P V N T K E M I F D T F Y M L F N L G L T A Y L I G N M T N L V V H	294		
AKT5	272	S I T T F S T T V G Y G D H G V N S R E M T F I L F Y M V F N L G L S A Y I I G N M T N L V V H	320		
AKT6	271	S I T T F S T T V G Y G D H G N N A E E R A F I L F Y M I F N L G L L A Y I I G n M T n L V V H	318		
AKT2	271	S I T T M T T V G Y G D L H A S N T I E M V F I T V Y M L F N L G L T A Y L I G N M T n L V V E	318		
AtKC1	283	S I V T L T T V G Y G D L H A V N S R E K T F N M F Y M L F N H G L T S Y H I G I M T n L V V H	330		
SKOR	282	A V V T M A T V G Y G D H A V N M R E M I F A M V Y I S F D M I L G A Y L I G N M T A L E V K	329		
SKOR2	211	A I V T M A T V G Y G D H A V N L R E M I F V M I Y V S F D M V L G A Y L I G N H T A L E V K	258		
SOR	243	A I I T M A T V G Y G D H A V N L R E M I F V M I Y V S F D M I L G A Y L I G N M T A L E V K	291		
KAT1	254	S I T T L T T V G Y G D F H A E N P R E M E F D I F F M M F N L G L T A Y L I G N M T n L V V H	301		
KAT2	265	S I T T L T T V G Y G D L H A E N P R E M E F D I F F M L F N L G F T S Y L I G N M T n L V V H	312		
SIRK	246	S I T T L T T V G Y G D L H A E N P R E M E F D I F F M L F N L G L T S Y L I G n M T n L V V H	292		

R3	8				
AKT1	295	G T S R T R N F R D T I Q A A S N F A H R N H L P P R L Q D Q M L A H L C L K Y R T D S E G L Q Q Q	344		
AKT5	321	V T G R T R K F R D T I Q A A S G F G Q R N N L P V R L Q D Q M V A H L C L R Y R T D S E G L Q Q Q	370		
AKT6	319	V T S R T R N F R D T I Q A A S A F A Q R N N L P L G L Q E Q M V A H L S L R Y R T D S E G L Q Q Q	368		
AKT2	319	G T R R T M E F R N S I E A A S N F V N R N R L P P R L K D Q I L A Y M C L R F K A - - E S L N Q Q Q	366		
AtKC1	331	G A L R T F A M R S A I N D I L R M T S N R L P D T M R I Q M L A H M Q L K K T - - A E L R O E	378		
SKOR	330	G - S K T E R F R D K M A D I M R M M N R N K L G R N R G Q I T G H L R L Q Y E S - - S Y T E A	375		
SKOR2	259	G - S N T E R F R D K M N D L I S F M N R K K L G R D L R S Q T G H V R L Q Y D S - - H Y T D T	304		
SOR	292	G - S K T E R F R D K M T D V I K M M N R N R L D R D V R N Q I K G H L R L Q Y E S - - G Y T E A	336		
KAT1	302	W T S R T R T F R D G V R A A S E F A S R N Q L P H D T E D Q M L S H T C L K E K T - - E G L K Q Q Q	349		
KAT2	313	W T S R T R N F R D T V R A A S E F A S R N Q L P P N T Q D Q M L S H T C L K E K T - - E G L K Q Q Q	360		
SIRK	293	W T S R T R D F R D T S A S E F A T R N Q L P P R T Q D Q M L S H L C L K E K T - - E G L K Q Q Q	339		

	9			10	
AKT1	345	E T L D A L P K A I R S S I S H E F Y S L M D K V Y L F R G V S N D L L F Q L V S E M K A E Y	392		
AKT5	371	E T I D S L P K A I R S S I S H Y L F Y E V V D K H Y L F H G I S N D L L F Q L V T E M K A E Y	418		
AKT6	369	E I I D S L P K A I R S S I S H Y L F Y E V V D K T Y L F H G I S N D L L F Q L V S E M K A E Y	416		
AKT2	367	H L I D Q L P K S I Y K S I C Q H L F L P S V E K V Y L F K G V S R E L L L L V S K M K A E Y	414		
AtKC1	379	E V L Q D L P K A I R S S I N Q H L F R S I E E A Y L F K G F P E G L L V Q L V S Q I Q A E Y	426		
SKOR	376	A V L Q D P V S I R A K I A Q T L Y L P Y T E K V P L F R G C S S E F I N Q V I V I R L H E E F	423		
SKOR2	305	V V L Q D P A S I R A K I A Q L L Y L P Y H K K V P L F K G C S T E F I N Q V I V I R L H E E Y	352		
SOR	337	S V I Q D L P I S I R A K I A Q T Y Y K P L V E K V S L F R G C S L E L I N Q I V I R V H E E F	383		
KAT1	350	E T L N N L P K A I R S S I A N Y L F E P I V H N Y L F Q G V S R N F L F Q L V S D I D A E Y	397		
KAT2	361	E A L N G L P K A I R S S I A N Y L F E P I V Q N V Y L F H G V S R N F L F Q L V S D I D A E Y	408		
SIRK	340	D T L N G L P R A I R S S I A H Y L F E P I A Q N V Y L F Q G V S Q D F L F Q L V S E V E A E Y	386		

R4	11			12	
AKT1	393	F P P K E D A V I L Q N E A P T D F Y I L V N G T A D I L V D V D T - G T E S I V R E V K A G D I I G E	441		
AKT5	419	F P P K E D A V I L Q N E A P T D F Y I L V P T G A V D I I T A R V N - G V E Q V V S E A Q R G H V E G E	467		
AKT6	417	F P P K E D A V I L R N E A P S D F Y I M V G A V D I I T A R V N - G V D C V V G E A Q T G H V E G E	465		
AKT2	415	I P P K R E D V I M Q N E A P D P Y I L V G E V D I I D S E M - E R E S V L G T R C G D I I G E	463		
AtKC1	427	F P P K M E I L Q N E I P T D F Y I L V G V D I I I S K G - V S E O V L A K E L G P G S M A G E	475		
SKOR	424	F L P G E V I M E Q G S V V D Q L Y F V C H G V I E E I G T K D G S E E I V A V L Q P D H S P G E	473		
SKOR2	353	F L P G E V I T E Q G N V V D H L Y F V C E G L L E A L V T K T D G S E E S V T L L G P H T S E G D	402		
SOR	384	F L P G E V I M E Q G N V V D Q L Y F V C H G M L E E I G I G A D G S E E T V L P L Q P N S S F G E	432		
KAT1	398	F P P K E D A V I L Q N E A P T D L Y I L V S G A V D F T V Y V D - G H D Q F Q G K A V I G E T F G E	446		
KAT2	409	F P P K E D A V I L Q N E A P T D L Y I L V S G A V D F T V Y V G - E E D Q V Q G K A V V G D A F G E	457		
SIRK	387	F P P K E D V I L Q R E A S T D I Y I L V S G A V D L I A Y I D - G H D Q I L G K A V A G D V E G E	434		
CAP		Y P S K S T L I H Q G E K A T L Y Y I V K G S V A V L I K D E E G K E M I L S Y L N Q G D F I G E			

AKT1	442	<b>I</b> G V L C Y R P Q L E T - - V R T K R I L C Q L I R M N R T T F L N T I O N	476
AKT5	468	<b>V</b> G V L C Y R P Q L E T - - V R T K R I L S Q L I R I N R T V L L N L V Q A	502
AKT6	466	<b>V</b> G V L C Y R P Q L E T - - V R T K R I L S Q L I R I N R T A F L N L V Q A	496
AKT2	464	<b>V</b> G A L G C R P Q S Y T - - F Q T K S L S Q L I R I L K T S F L I E T M Q I	498
AtKC1	476	<b>H</b> G V V F N I P Q P F T - - V R T R R D S Q V I R I G H H K F K E M V Q S	510
SKOR	474	<b>H</b> S I I L C N I P Q P Y T - - V R V A E L C R I L R I D K Q S F M N I L E I	508
SKOR2	403	<b>I</b> S I I L C N I S Q P F T - - V R V C E L C H I L R I D K Q S F S N I L E I	437
SOR	433	<b>H</b> S I I L C N I Q P Y T - - V R V L E L C R I L R I D K Q S L Q I I L E I	468
KAT1	447	<b>V</b> G V L Y Y R P Q P F T - - V R T T E L S Q I L R I S R T S L M S A M H A	481
KAT2	458	<b>I</b> G V L C Y T P Q P F T - - V R T T E L S Q I L R I S K K S L M S A M R A	492
SIRK	435	<b>H</b> G V L C Y R P Q S L T - - V R T S E L S Q I L R L S R T S L M N A Q R A	469
CAP		<b>L</b> G L F E E G - Q E R S A W V R A K T A C E V A E I S Y K K F R Q L I Q V	

		13      14	15	
AKT1	477	N V G D G T I I M M N N L Q H L K E M N D P V M T N V L L E I E - N M I A R G K M D I P L P L N L C F A	525	
AKT5	503	N V G D G A I I M M N N L L Q H L K D S E D P V M K G V L A D T E - H M L A Q G K M D I P L S L C F A	552	
AKT6	501	N V G D G A I I M M N N L L Q H L K D S T D P V M K G V L A E T E - L M L A Q G K M D I P L S L C F A	559	
AKT2	499	K Q Q D N A T M D K N F L Q H H K K L S N L D I G D L K A Q Q N G E N T D V V P P N I A S N L I A V	548	
AtKC1	511	D N D V D A K M I I A N F M T Y L K G L N D E L K K E I P F I R D L L D D A D A Q V Q E T V Q S E E	561	
SKOR	509	F F H D G R R I L I N N L L E G K E - - S N V R I K Q K L E S D I T - F H T S K Q E A D V A L K L N S A	555	
SKOR2	485	Y F H D G R T I L I N N I M E E K E - - S N D R I K K L E S D I V - H I G K Q E A E D A L K V N S A	437	
SOR	469	Y F Y D G R R I L I N N L L E G K E - - S N L R V K Q K L E S D I T - F H I G R Q E A E L A L R V N S A	514	
KAT1	482	H A D D G R V I M M N N L F M K L R G Q Q S I A I D D S N A S G H E N R D F K S M G W E E W R D S R K	531	
KAT2	493	H V E D G R V I M M N N L F M K L R G Q Q S I A I D D P N S S P E S L I K E W L V C G S K T G E G N A	542	
SIRK	470	N M E D G P I I M M N H L F K K L K G L E S S G E T D P H M D P S I T R E W I D G V P P G G S L S H	518	
Anky			- G - T P L H - A	

		16	17	
AKT1	526	A I R E D D D L L I H Q L L K R G L D P N E S D N N G R T P L H I A A S K G T L N C V I L L L E Y H A	575	
AKT5	223	A A R G D D D L L I H Q L L R R G S S P N E M D K D G R T A L H I A A S K G S H Y C V V I L L E H G A	602	
AKT6	550	A A R G D D D L L I H Q L L K R G S N P N E T D K N G R T A L H I A A S K G S Q Y C V V I L L E H G A	599	
AKT2	549	V T T G N A A L L D E L L K A K L S P D I T D S K G K T P L H V A A S R G Y E D C V L V L L K H G C	598	
AtKC1	561	T P Q S N D E E I V T V S R H E N G Q I E R R R E G - - - - -	587	
SKOR	556	A F Y G D L Y Q L K S L I R A G G D P N K T D Y D G R S P L H A A S R G Y E D I T H Y L Q E S V	605	
SKOR2	485	A F Q G D F Y Q L K S L I R R S G A D P N K T D Y D G R S P L H A A C R G Y E D I T F L Q E G V	534	
SOR	515	S Y H G D L Y Q L K S L I R A G A D P N K T D Y D G R S P L H A A S R G Y E D I T F L Q E G V	563	
KAT1	532	D G Y G L D V T N P T S D T A L M D A I H K E D T E M V K K I K E Q K I E R A K E E R S S S E S A	581	
KAT2	543	S D Q G H G H K Y L Q L H D S E N I D M G S T E W R D S R K S G Y E T K R V R E H T T E E E G E	592	
SIRK	519	A G C E D Q S P H G D P S I Q E A R D I G L L G S E A T K K S - - - - -	549	
Anky		A - - G H - - - V - - L L - - G A - - N - - - -   G - T P L H - A A - - G H - - - V - - L L - - G A		
		A	D	A

		18		
AKT1	576	D P N C R D A E G S V P L W E A M V E G H E K V V R K V L L E H G S T H D A G D V G H E A C T A A E Q	625	
AKT5	603	D P N I R D S E G N V P L W E A M V E G H E K V V R K V L L E H G S T H D A G D V G H E A C T A A E Q	651	
AKT6	600	D P N I R D S E G S V P L W E A M V E G H E K V V R K V L L E H G S T H D A G D V G H E A C T A A E Q	649	
AKT2	599	N I H I R D V N G N S A L W E A T S K H Y E H F R I L Y H F A A I S D P H I A G D L L C E A A K Q	648	
AtKC1		- - - - -		
SKOR	606	D V N I R D K L G S T P L L P A K N G N D R V A A L L V K E G A P L N N A C T F L C T V V V A X	655	
SKOR2	535	D V N L K D K F G H T P L P E A V K A G Q E G V I G L L V K E G A S F N L E D S G N F L C T T V A K	584	
SOR	564	D V N S D N F G N T P L L P A K N A H D R V A S L L V N K G A L E K I D D A G G E L C C T I A R	612	
KAT1	582	G R S Y A N D S S K K - - - - - D P Y C S S S N Q I T K P C K R - - - - -	608	
KAT2	593	K P N K E F D G K G C S D A D L T S F E F H S Q E A Y P Y C S S N I Q I K Q H E A A K P - - - - -	636	
SIRK		- - N - - - -   G - T P L H - A A - - G H - - - V - - L L - - G A - - N - - - -   T P L H - A A - -		
Anky		D	A	D

AKT1	626	G N L K L L K E I V L H G G D V T R P R A T G T S A L H T A V C E E N T E M V K Y L L E - Q G A D V	675
AKT5	652	N C I D P A L K D I I K Y G G D V T L P D G N G T T A L H R A V S E G H L E I V K F L L D - Q G A D L	701
AKT6	650	N N I L N A I K D I V K Y G G D I S L S D V N G T T A L H R A V S E G N L E I V Q F L L E - K G A D M	699
AKT2	649	N N I E V M K A L L K Q G L N V D I E D H H G V T A L Q V A M A E D Q M D M V N L L A T - N G A D V	698
ATKC1	-	-	-
SKOR	656	G D S D F I L K R L L S N G I D P N S K D Y D H R T P L H V A A S E G F Y V L A I Q L V E - A S A N V	705
SKOR2	585	G D S D F I L K R L L S S G M D P N S E D Y D H R T P L H V A A S E G L F I L M A K M L V E - A G A S V	634
SOR	613	G D S D F I L K R I L S N G I D P N S K D Y D H K T P I H V A A S G R V I F Y G K V A F R K A G A S V	661
KAT1	-	-	-
KAT2	-	-	-
SIRK	550	- K A D K A H E S T G C G I D A N S A A E D G Q T A L H V A V C N G H L E M V R I L L E - R G A N V	596
Anky	-	G H - - V - - L L - - G A - - N - - - G - T P L H - A A - - G H - - V - - L L - - G A - -	-
	A	D	A
	19		20
AKT1	676	N K Q D M H - G W T P R D L A A Q Q O G H E D I K A L F R E K L H E R R V H I E T S S S V P I L K T G	723
AKT5	702	D W P D S M - G W T P R G L A D H Q O G N B E T R T L F H N H R P V E K K P K D I P G I P Q S P V T G	749
AKT6	700	D K P D V Y - G W T A R A L A B H Q O G H E D I K A L F Y N Q R P V E R K T I L V S G T P E I - - -	743
AKT2	699	V C V N T H N E F T P L E K L R V V V E E E E E E -	722
ATKC1	-	-	-
SKOR	706	L A K D R W - G N T P L D E A L G C G N K M L I K L L E D A K N S Q I S S F P S G S K E P K D K V -	751
SKOR2	635	I S K D R W - G N S P L N E A R L C G N K K L I K L L E D T K N A Q S S I Y P T S L R E L Q E R I	681
SOR	662	F S K D R W - G N T P L D E G W K C G N K N L M K L L E D A K V A Q L S E F P D C S R E I T D K M	706
KAT1	-	-	-
KAT2	-	-	-
SIRK	597	N K K D A R - G W T P K A L A E Q E G K K S I Y D L L L S Y E N R R L L D E H K I H F I G S D A A D	622
Anky	-	N - - - - G - T P L H - A A - - G H - - V - - L L - - G A - - N - - -	-
	D	A	A
	21		
AKT1	724	I R F L G R E T S E P N G R P A S R E V S F R I E R - - T R A R R K T N N F D N S L F G I L A N Q S	771
AKT5	750	K P - L M K Y S S E P T M H S G E L V L D G G Q V V - - V S Q K R K L N N F R N S L F G I I S A A N	796
AKT6	744	K P - L M K H S S E P V M T H H H S R E A M P P L A R A V S Q R R K L S N F K N S L F G I M S A A K	794
AKT2	-	-	-
ATKC1	-	-	-
SKOR	-	-	-
SKOR2	-	-	-
SOR	-	-	-
KAT1	-	-	-
KAT2	-	-	-
SIRK	623	C C T S Q G L H T R T G G P N F H N S Q F K K V S T N S N S G S P S P P G N K D V M T L - - - - -	667

R6

AKT1	787	N P V R V T I S C - - - A E K D D I - - - A G K L V L L P G S F X E L L E I G S N K F G I - V	826
AKT5	819	Y P E R V T I S S - - - P E N G E T - - - G G K V V L L P N S M E E L L K I G E N K M G F - V	858
AKT6	813	Y P A R V T I S G - - - E A S S - - - S G K V V K L P D S L E E L I E T G E K K L G F - V	850
AKT2	723	E R G R V S I Y R - G - H P L E R I R E R S C N E A G Y L I L L P P S I L D D L K K T A G E K F G F D G	771
A1KC1	588	V P K R V I I H G Q A - P P N Q D N K N N G D S N G L I I L L P D S I Q L L F D L A E K K L G K - -	635
SKOR	753	Y K K K C T V Y F - S - H P G D S S K E K R R - - R G I V W W W P R S I E E L I R T A K E Q L N V - P	798
SKOR2	682	E R R K C T V F P - F - H P Q E A K E E R S R K H G V V V W I P S N D P E K L I V T A K E E L G L S - D	730
SOR	708	H P R K C T V F P - F - H P W D P K E - H K R P - G I M P W V V P Q I E E L T K T A T E E G L Q F - S	753
KAT1	609	E E K R V T I H M - - - M S E S K - - - N G K L I L V P S S I E E L R L A S E K F G G - C	648
KAT2	637	K D K R V T I H L - - - K S R D K D - - - L S K L I I L P A S I E E L R L A G E K F G G Y - -	678
SIRK	668	T K R R V T I H R Q F Q N A S T S - - - Q G Q L G K L I I L P D S I E E L Q I A G Q G F G G - -	711

AKT1	827	A T K V I M N - K D D N N A E I D D V D V I R D G D H L I F A T D S	857
AKT5	859	P T K V I L T - R E G - A E I D D I T L I R D G D F L L L S R D P	888
AKT6	851	A T K I I S - R E G - A E I D D I R I I R D G D F L L L K V S	880
AKT2	772	S E T M V T - N E D G A E I D S I E V I R D N D K L Y F V V N K I I	802
AtKC1	636	R G I S T I A - M A D G A H V E Q I D A L R E N D H L Y I F	662
SKOR	799	E A S C V L - S E D E A K I I D V D L I S D G Q K L Y L A V E T	828
SKOR2	731	G A S F V L L S E D Q G R I T D I D M I S D G H K L Y M S D T T D Q T	766
SOR	754	S E S C I L - S E D G G K I L D V D M I S D G Q K L Y L L C E T L D I	788
KAT1	649	N F T K I T - N A D N A E I D D E L V I W D G D H L Y F S S N	677
KAT2	677	S F T K V T - N A E N A E I D D E D V I R D G D H L Y I L I N E N S	708
SIRK	712	N P T K V V - S A G N A E I D D I S V I R D G D H L F L L Q N E N G T T I T M L P N G Y	756

Figure 1.4 : alignement des séquences protéiques des canaux potassiques d'*Arabidopsis* (AKT1, AKT2, AKT5, AKT6, AtKC1, SKOR, SKOR2, KAT1, KAT2) et de vigne (SOR et SIRK). Les séquences sont alignées région par région. R1 : région N-terminale. R2 : domaine transmembranaire. R3 : domaine de jonction. R4 : domaine potentiel de fixation des nucléotides cycliques. R5 : domaine variable. R6 : domaine K<sub>HA</sub>. La position des segments transmembranaires de la région R2 est indiquée par un trait au-dessus des alignements. Elle a été déterminée en utilisant un programme de prédiction de ces structures à partir de la séquence primaire des protéines. La séquence de la protéine CAP d'*E.coli* a été alignée en-dessous des séquences de la région R4. La séquence du motif ankyrine (Anky; Lux *et al.*, 1990) a été alignée au-dessous des séquences de la région R5. Les nombres à gauche et à droite des alignements indiquent la position de l'acide aminé en regard dans la séquence polypeptidique. Les résidus identiques sont écrits sur fond noir. Les acides aminés appartenant au même groupe de substitution conservative sont indiqués sur fond gris clair. Les 7 groupes de substitution sont : 1: K et R; 2 : D et E; 3 : N et Q; 4 : A et G; 5 : S et T; 6 : I, M, L et V; 7 : F, W et Y. Les tirets correspondent à des décalages introduits pour maximiser les alignements. La position relative des introns dans les gènes codant ces protéines est indiquée par un trait vertical et un numéro placé au-dessus des alignements.

polypeptide (Daram *et al.*, 1997). Cette interaction participerait au processus de tétramérisation.

La région R4 correspond à un domaine potentiel de fixation de nucléotides cycliques ("NMPc"). Elle présente environ 30 % d'identité avec le domaine de fixation de l'AMPc de la protéine CAP d'*E. coli* ou des sous-unités régulatrices de protéines kinases (figure 1.4). Elle présente 25 % d'identité avec le domaine de fixation des nucléotides cycliques des canaux cationiques animaux régulés par la GMPc. Les analyses électrophysiologiques des canaux AKT1 et KAT1 ont suggéré une régulation de leur activité par la GMPc (Hoshi, 1995; Gaymard *et al.*, 1996). Cependant, nous ne disposons d'aucune donnée directe prouvant l'existence d'une interaction entre la GMPc et le site potentiel de fixation de nucléotides cycliques.

La région R5 sépare R4 de la séquence C-terminale. C'est la région la plus variable, en taille et en séquence. En effet, chez les canaux AKT1, AKT2, AKT5, AKT6, SKOR et SKOR2, cette région correspond à un domaine ankyrine. Ce domaine est défini par la répétition en tandem d'un motif de 33 acides aminés apparenté au motif ankyrine : GTPLH-AA-GH---(V/A)--LL--GA--(N/D)--- (Lux *et al.*, 1990). Les domaines de type ankyrine sont supposés intervenir dans les interactions protéine-protéine (Hoffman, 1991), notamment celles impliquant les protéines du cytosquelette. AKT2 comporte 5 répétitions distinguables du motif ankyrine, et le début d'une sixième (figure 1.4). Les autres canaux mentionnés ci-dessus contiennent 6 répétitions complètes. Les trois autres canaux : KAT1, KAT2 et AtKC1, sont dépourvus de domaine ankyrine. Leur séquence dans cette partie de la protéine ne présente pas de similarité avec des protéines connues et ne constitue pas un domaine structural clairement identifiable. KAT1 et KAT2 partagent toutefois 2 motifs relativement conservés (EWRDSRK[S/D]GYG et PYCSS[S]N[I]QI) mais n'occupant pas la même position (figure 1.4). Ces différences dans la séquence de la région R5 se traduisent donc par des longueurs très variables, de 77 résidus dans AtKC1 à près de 300 résidus dans AKT1, AKT5 ou AKT6.

La dernière région, R6, est l'extrémité C-terminale, appelée domaine  $K_{HA}$ . Les similarités de séquence sont importantes dans ce domaine, ce qui est surprenant par rapport aux divergences observées dans le domaine précédent (figure 1.4). Le terme de  $K_{HA}$  est dû à la richesse en résidus hydrophobes et acides de cette région (Ehrhardt *et al.*, 1997). Des expériences en double-hybride chez la levure suggèrent que le domaine  $K_{HA}$  interagit avec le domaine de jonction et R3, lors de la tétramérisation du canal (Daram *et al.*, 1997). Par ailleurs, l'analyse de la fluorescence émise par des cellules d'insecte *Sf9* exprimant une protéine chimérique "canal-GFP" suggère que le domaine  $K_{HA}$  serait impliqué dans un phénomène de regroupement ("clustering") des canaux sur la membrane (Ehrhardt *et al.*, 1997).

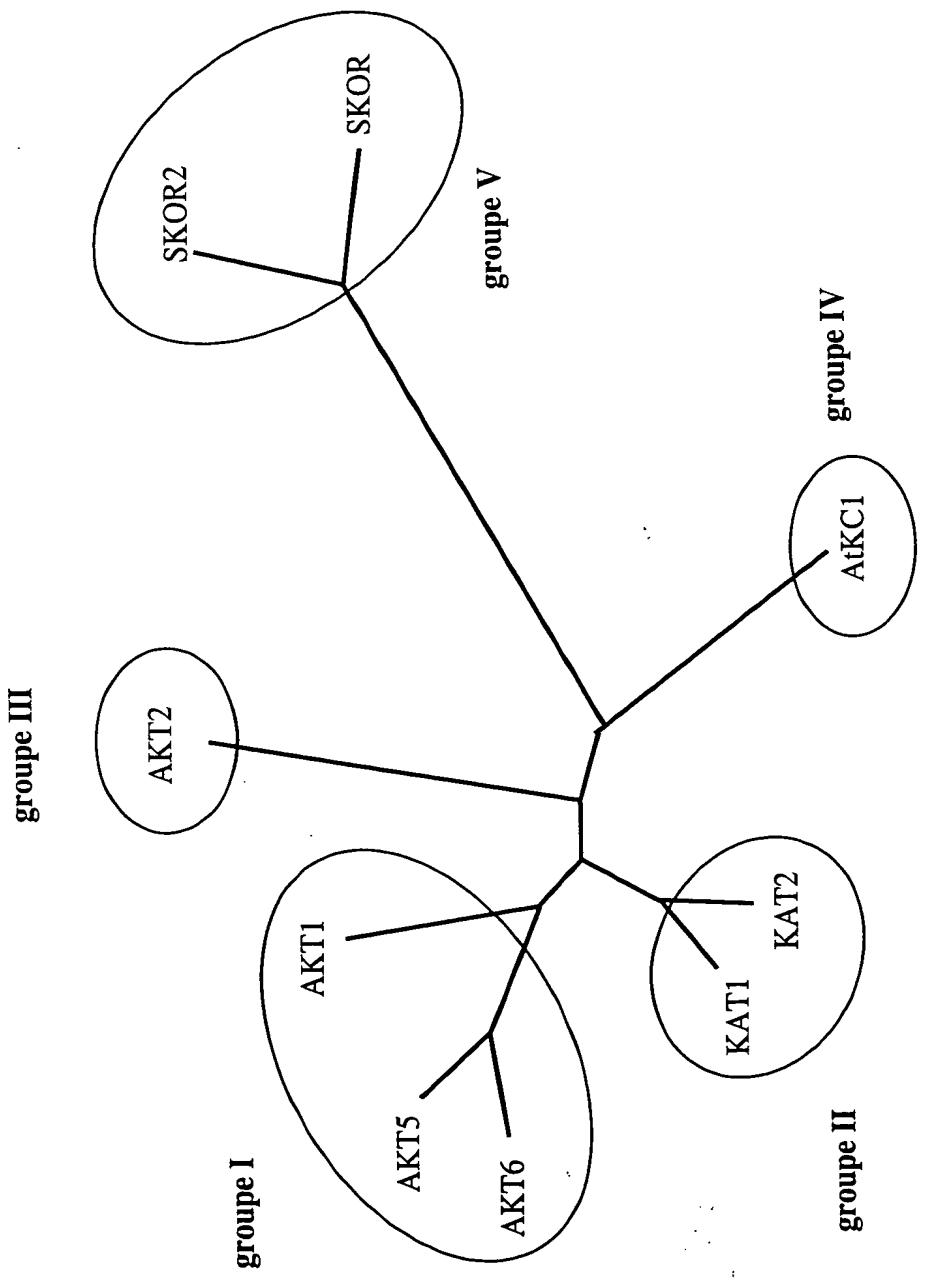


Fig 1.5 : arbre phylogénique des canaux potassiques de type Shaker d'*Arabidopsis*.

Il est construit grâce au logiciel Darwin (Gonet et al., 1992), à partir des séquences protéiques des 9 canaux connus à l'heure actuelle. La longueur des branches est proportionnelle à la distance évolutive séparant chaque nœud. Les différents sous-groupes sont entourés. Les canaux AKT2 et AtKC sont définis comme "groupes", car parmi les autres canaux de type Shaker végétaux, certains leur sont apparentés, ce qui permet de les réunir en groupes. Les numéros d'accession pour chaque canal sont : AKT1 (S23606); AKT5 (AAD31377); AKT6 (CAA22577); KAT1 (S32816); KAT2 (T04931); AKT2 (AAA97865); AtKC1 (g7488024); SKOR (CAA11280); SKOR (CAAA11280); SKOR2 (BAC MPA22, Ac n°AB025630).

Les relations phylogéniques existant entre les canaux d'*Arabidopsis* sont représentées sur la figure 1.5. Trois groupes sont nettement distincts. Le premier comprend les canaux AKT1, AKT5 et AKT6 (groupe AKT ou I). Le second groupe comprend KAT1 et KAT2 (groupe KAT ou II), et le troisième les canaux SKOR et SKOR2 (groupe SKOR ou V). AKT2 et AtKC1 n'appartiennent à aucun groupe et ne peuvent se regrouper. Sur la base des connaissances actuelles, les canaux d'un même groupe possèdent des caractéristiques électrophysiologiques proches. Les canaux des groupes AKT (I) et KAT (II) sont de type fortement rectifiant entrant. Les canaux du groupe SKOR (V) sont dotés d'une rectification sortante. AKT2, doté d'une faible rectification entrante, est localisé sur l'arbre phylogénique présenté, à mi-distance entre les canaux entrants AKT et KAT et les canaux sortants (SKOR).

### **Structures géniques**

Les gènes codant les canaux potassiques présentent des similarités structurales. Une dizaine d'introns interrompt les séquences codantes : de 8 pour *KAT1* à 12 pour *AtKC1*. Les différents gènes ne possèdent pas tous la même structure intronique, mais en général, pour une position d'intron donnée, plusieurs gènes possèdent l'intron correspondant. Les structures géniques des canaux semblent d'autant plus similaires que les canaux sont proches dans l'arbre phylogénique présenté sur la figure 1.5. De fait, un arbre construit sur la base de la position des introns (Pilot, 1999) est presque identique à l'arbre construit à partir des séquences protéiques (figure 1.5). Une autre caractéristique des gènes des canaux potassiques est le fait que, pour une position d'intron donnée, le site d'insertion de l'intron par rapport au codon est très conservé. Par contre, chaque intron de chaque gène possède une longueur qui lui est propre. Elle est en général inférieure à 200 pb, ce qui correspond à une longueur normale chez *Arabidopsis* (Hawkins, 1988; Brown *et al.* 1996). Il faut noter cependant que le premier intron possède une longueur inhabituellement grande dans le cas de certains canaux : 1 kpb chez AKT1, 0.6 kpb chez SKOR, et 0.5 kpb chez AKT6.

#### **1.5.3 Les autres canaux Shaker végétaux**

Des canaux de type Shaker ont été clonés chez plusieurs autres végétaux. Ils présentent de fortes similarités de séquence avec les canaux d'*Arabidopsis*. Deux canaux ont été identifiés chez la pomme de terre : KST1 et SKT1, qui pourraient être respectivement les orthologues de KAT1 et AKT1. Comme KAT1, KST1 est exprimé dans les cellules de garde, et ses caractéristiques fonctionnelles, très proches de celles de KAT1, sont identiques à celles du canal rectifiant entrant caractérisé sur la membrane de la cellule de garde de pomme de terre (Müller-Röber *et al.*, 1995). Le canal SKT1 est exprimé dans l'épiderme des feuilles, les cellules de garde et les racines, ce qui est relativement proche du profil d'expression d'*AKT1*.

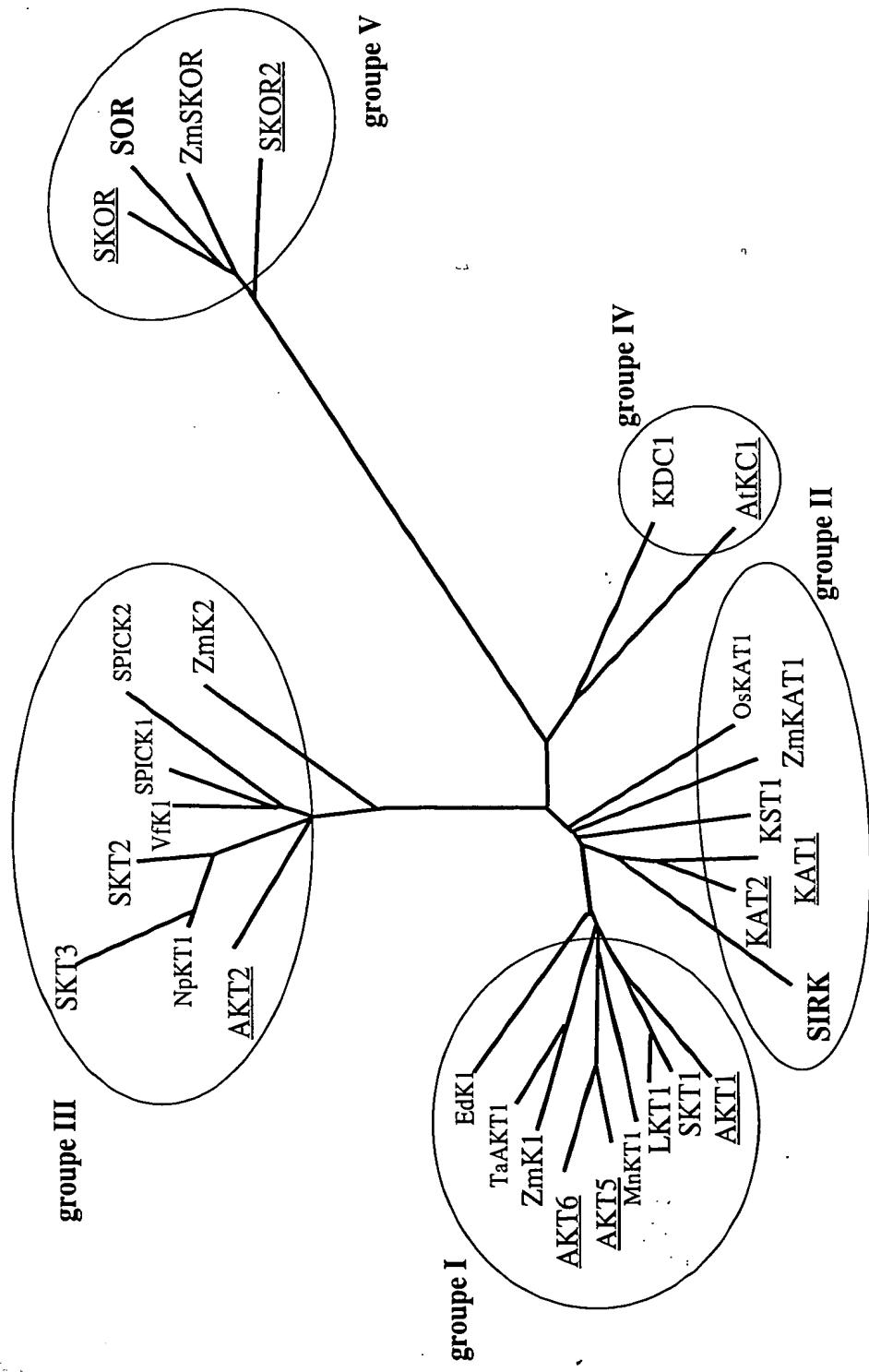


Figure 1.6 : arbre phylogénique des canaux potassiques végétaux de type Shaker. Il est construit grâce au logiciel Darwin (Gonet *et al.*, 1992), à partir des séquences protéiques des 29 canaux connus à l'heure actuelle. La longueur des branches est proportionnelle à la distance évolutive séparant chaque nœud. Les différents sous-groupes sont entourés. Les canaux d'*Arabidopsis* sont soulignés. Les deux canaux de vigne (SOR et SIRK) clonés au cours de cette thèse sont indiqués en caractères gras. Les numéros d'accès pour chaque canal sont : AKT1 (S23606); SKT1 (T07651); ZmK1 (T03939); EdK1 (CAA12645); AKT5 (AAD31377); AKT6 (CAA22577); KAT1 (S32816); KAT2 (T04931); KST1 (S55349); AKT2 (AAA97865); NpKT1 (BAA84085); SKT2 (T07052); SKT3 (T07055); VfK1 (T12177); SPICK1 (AAD16278); SPICK2 (AAD39492); ZmK2 (CAB54856); AtKC1 (G7488024); SKOR (CAA11280); MnKT1 (AAF81249); TaAKT1 (Af207745); LKT1 (X96390); SKOR2 (BAC MPA22, Ac n° AB025630); OsKAT1 (chromosome 1, locus AP 002092, clone P0031E09). Les séquences de ZmKAT1 et de ZmSKOR sont des communications personnelles de Su Yan-Hua et Carine Alcon (résultats non publiés).

Ses caractéristiques fonctionnelles sont également très semblables à celles d'AKT1 : SKT1 est un canal de type rectifiant entrant (Zimmerman *et al.*, 1998; Hartje *et al.*, 2000).

A ce jour, 4 canaux potassiques ont été identifiés chez le maïs. *ZmK1* (apparenté à *AKT1*) est exprimé dans tout le coléoptile, et semble intervenir dans le prélèvement de K<sup>+</sup> par les cellules de cet organe, permettant l'augmentation de la pression de turgescence et la croissance (Phillipar *et al.*, 1999). Un deuxième canal, *ZmK2*, présente le plus de ressemblance avec *AKT2*. Il est exprimé dans les tissus vasculaires du coléoptile (Phillipar *et al.*, 1999). Les deux autres canaux ont été clonés au laboratoire : *ZmKT1* et *ZmSKOR*. *ZmKAT1* est codé par un paralogue de *KAT1* (Yan-Hua, communication personnelle), et *ZmSKOR* (Alcon, communication personnelle) est un canal sortant, exprimé dans la stèle racinaire, comme *SKOR* chez *Arabidopsis*.

Un paralogue de *KAT1* a été identifié chez le riz (*OsKAT1*, n° d'accession AP002092). La carotte possède un paralogue d'*AtKC1* (*KDC1*, AJ249962, Downey *et al.*, 2000). Un paralogue d'*AKT2* est présent chez le tabac (*NpKT1*, BAA84085) et chez *Vicia faba* (*VfK1*, T12177). Des paralogues d'*AKT1* ont été récemment clonés chez le blé (*TaAKT1*, AF207745), *Mesembryanthemum crystallinum* (*MnKT1*, AF267753), la tomate (*LKT1*, Hartje *et al.*, 2000) et *Egeria densa* (*EdKC1*, AJ225805). Enfin, deux représentants des canaux Shaker de vigne, SOR et SIRK, ont été clonés au cours du travail présenté dans cette thèse.

L'arbre phylogénique construit à partir des séquences protéiques de tous les canaux de type Shaker végétaux (figure 1.6) montre que les 5 groupes déterminés chez *Arabidopsis* se retrouvent à l'identique lorsque l'on prend en compte toutes les espèces. Cela suggère que les canaux potassiques sont des protéines anciennes, dont l'existence et la répartition ont été fixées avant la séparation des monocotylédones et des dicotylédones.

## 1.6 Les autres canaux potassiques végétaux

Quelques années après l'identification de la famille Shaker chez *Arabidopsis*, trois autres familles de canaux potassiques ont été identifiées par le séquençage systématique du génome de cette plante. Ces nouvelles familles sont appelées *KCO1*, *KCO3* et *cNGC*. Chacune de ces familles est caractérisée par une structure rappelant celle d'une famille de canaux animaux. Les 3 familles de canaux animaux correspondantes sont appelées *TWIK*, *Kir* et *cNGC*.

### 1.6.1 Les familles *KCO1* et *KCO3*

Le premier membre de la famille *KCO* a été cloné en 1997 chez *Arabidopsis* (Czempinski *et al.*, 1997). Le canal *KCO1* présente des similarités de séquence avec les canaux animaux de la famille *TWIK* (Lesage *et al.*, 1996) et possède la même structure : quatre segments

transmembranaires, appelés M1 à M4, et deux domaines P, appelés P1 et P2, impliqués dans la formation du pore, et s'intercalant entre M1 et M2 et entre M3 et M4 respectivement (figure 1.1). La partie C-terminale de ces protéines comporte 2 mains EF, qui fixent  $\text{Ca}^{2+}$ . KCO1 est un canal à rectification sortante (c'est le premier canal potassique sortant cloné chez les végétaux). Exprimé dans des cellules d'insecte, il est activé par une augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. Quatre paralogues, KCO2, 4, 5, et 6 ont été récemment clonés (Czempinski *et al.*, 1999) ou identifiés suite au séquençage systématique du génome d'*Arabidopsis*.

Un canal d'un type différent des types Shaker et KCO1, apparenté aux canaux animaux de la famille Kir (Jan et Jan, 1997), a été identifié chez *Arabidopsis*. Il a été appelé pour l'instant, de façon regrettable, KCO3 (Czempinski *et al.*, 1999). Ce canal, comme les canaux animaux Kir, ne présente que deux domaines transmembranaires, M1 et M2, encadrant un pore (figure 1.1). Il s'agit probablement d'un canal peu sélectif de  $\text{K}^+$ , car la séquence primaire de son pore ne comporte pas la signature (motif GYGD) des canaux sélectifs.

Nous n'avons encore aucune information sur le rôle des canaux de ces deux familles dans la plante.

### 1.6.2 La famille des cNGC

Des canaux susceptibles d'être activés par les nucléotides cycliques (sur la base des similarités de structure et de séquence qu'ils présentent avec des canaux cationiques animaux activés par les nucléotides cycliques) ont été clonés chez diverses plantes (orge, tabac, *Arabidopsis*; 19 représentants chez cette dernière espèce). Ils comportent 6 segments transmembranaires, avec un pore présent entre le 5<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> segment, ainsi qu'un domaine de fixation des nucléotides cycliques dans la région C-terminale cytoplasmique (figure 1.1). Ce domaine est chevauchant avec un site susceptible de fixer la calmoduline, suggérant une interaction directe entre nucléotides cycliques et calmoduline dans la régulation de l'activité du canal. Certains de ces canaux semblent pouvoir compléter des levures déficientes pour le transport de  $\text{K}^+$  (Kohler *et al.*, 1998; Leng *et al.*, 1999), mais leur pore ne comporte pas la signature des canaux sélectifs du  $\text{K}^+$  (la séquence GYGD; Cf. les canaux de type Shaker). Les caractéristiques de plusieurs de ces canaux ont été explorées dans l'ovocyte de xénope (Leng *et al.*, 1999). Il semble qu'ils permettent des influx de plusieurs cations ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) et qu'ils soient donc peu sélectifs de  $\text{K}^+$ . Le rôle de ces canaux dans la plante n'est pas encore connu.

## 1.7 Absorption du potassium par la racine

### 1.7.1 Le transport dans le domaine des faibles concentrations

Les caractéristiques cinétiques et électrophysiologiques de l'absorption de  $K^+$  par la racine ont été essentiellement analysées dans les années 70 et 80, en prenant le plus souvent des racines de graminées (maïs, orge) comme modèle (voir la revue de Kochian et Lucas, 1988). *Arabidopsis* s'étant imposée comme plante modèle, différents groupes ont analysé, dans les années 90, les caractéristiques du prélèvement de  $K^+$  par la racine de cette espèce. Les données obtenues chez cette plante sont, globalement, en accord avec les observations faites chez les autres espèces. Les mesures de potentiel de membrane réalisées par Maathuis et Sanders (1993) et Gassman *et al.* (1993) indiquent que l'absorption de  $K^+$  par les cellules épidermiques et corticales de la racine d'*Arabidopsis* résulte d'un transport actif lorsque la concentration extérieure de  $K^+$  est inférieure à  $0,4 \text{ mmol.l}^{-1}$  environ. Les valeurs de potentiel enregistrées par Hirsch *et al.* (1998) sont nettement plus négatives, et situent le seuil de concentration de  $K^+$  en deçà duquel le transport doit être actif dans la gamme de  $10\text{-}100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Chez un mutant n'exprimant plus le canal AKT1, le potentiel est encore plus négatif, ce qui autoriserait un transport de type passif même dans la gamme des très faibles concentrations (inférieures à la dizaine de  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ).

Trois types de transporteurs pouvant assurer un influx actif de  $K^+$  ont été envisagés : une ATPase pompe d'ions  $K^+$ , un symport  $Na^+:K^+$ , et un symport  $H^+:K^+$ . De nombreuses approches biochimiques ont été conduites dans le cadre de la première hypothèse, mais aucune d'entre elles n'a apporté d'argument en sa faveur (Gibrat *et al.*, 1990). La seconde hypothèse est affaiblie par l'observation que la présence de  $Na^+$  dans le milieu n'est pas nécessaire à l'absorption de  $K^+$  par la racine, mais, au contraire, tend à inhiber cette fonction (Maathuis *et al.*, 1996). Par contre, l'absorption de  $K^+$  à partir d'une solution contenant de faibles concentrations de potassium (autour de  $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) est étroitement associée à une dépolarisation de la membrane et à une entrée de  $H^+$ , chez le maïs (Kochian *et al.*, 1989) et chez *Arabidopsis* (Maathuis et Sanders, 1994; Maathuis et Sanders, 1997). Les analyses quantitatives conduites chez *Arabidopsis* suggèrent que l'absorption du potassium dans la gamme des faibles concentrations est couplée à une entrée de  $H^+$ , avec un rapport stœchiométrique de 1. Ces dernières données semblent donc en faveur de l'hypothèse du symport  $H^+:K^+$ . Des transporteurs de type KUP pourraient être à l'origine de ce transport.

### 1.7.2 Le transport dans le domaine des fortes concentrations

Kochian *et al.* (1985) ont montré que la composante de l'absorption du potassium correspondant au mécanisme 2 d'Epstein est sensible au TEA, suggérant l'intervention de canaux potassiques. Des expériences de patch-clamp menées sur des protoplastes de racines

de plusieurs espèces (maïs, seigle, blé, *Arabidopsis*) ont révélé que des canaux potassiques entrants et sortants sont présents sur la membrane plasmique des cellules épidermiques et corticales (Gassmann et Schroeder, 1994; Maathuis et Sanders, 1995; Roberts et Tester, 1995; White et Lemtiri-Chlieh, 1995). Chez *Arabidopsis*, deux conductances entrantes, de 5 et 20 pS, ont été mises en évidence (la seconde étant plus fréquente), ainsi qu'une conductance potassique sortante (Maathuis et Sanders, 1995; Maathuis et Sanders, 1997). Les caractéristiques électrophysiologiques des deux conductances entrantes sont compatibles avec un rôle dans l'absorption de K<sup>+</sup> par la racine. Le canal potassique sortant pourrait participer au contrôle de la polarisation de la membrane (repolarisation après une dépolarisation résultant de la transduction d'un signal par exemple).

Chez *Arabidopsis*, le canal potassique AKT1 (Sentenac *et al.*, 1992) participe probablement à la fonction d'absorption de K<sup>+</sup>. AKT1 est un canal entrant, régulé par le voltage, et très sélectif de K<sup>+</sup> (Gaymard *et al.*, 1996). Ses transcrits sont principalement détectés dans les racines (Basset *et al.*, 1995; Lagarde *et al.*, 1996). L'analyse de l'expression d'un gène chimérique constitué du promoteur d'AKT1 fusionné à GUS indique que le gène est exprimé au niveau des couches épidermique et corticale des régions matures de la racine, c'est-à-dire dans les cellules responsables de l'absorption à partir de la solution du sol (Lagarde *et al.*, 1996). Une lignée mutante d'*Arabidopsis* présentant une insertion de l'ADN-T d'*Agrobacterium* dans le gène AKT1 a été caractérisée (Hirsch *et al.*, 1998; Spalding *et al.*, 1999). L'inactivation d'AKT1 se traduit par la disparition de la principale conductance potassique entrante des cellules corticales de la racine. Au niveau de la plante entière, cette mutation se traduit par un retard de croissance. Ce retard n'apparaît cependant que dans des conditions particulières : la concentration de K<sup>+</sup> dans le milieu de culture doit être faible (inférieure à 1 mmol.l<sup>-1</sup>), et NH4<sup>+</sup> doit être présent à une concentration relativement élevée (2 mmol.l<sup>-1</sup>). Ces observations ont conduit aux deux conclusions suivantes. (1) AKT1 participerait de façon conséquente au prélèvement de K<sup>+</sup> même dans le domaine des faibles concentrations (les mesures du potentiel de membrane révélant des valeurs très négatives, rendant le gradient de potentiel électrochimique de K<sup>+</sup> favorable à l'influx). (2) Outre AKT1, un second système de transport participerait à l'absorption de K<sup>+</sup> dans le domaine des faibles concentrations. Ce système serait capable de pallier complètement à l'absence d'expression d'AKT1 chez le mutant et d'assurer, à lui seul, un influx de K<sup>+</sup> suffisant aux besoins de croissance. Cependant, ce système serait très sensible à la présence de NH4<sup>+</sup> dans le milieu. Cela expliquerait qu'en présence de NH4<sup>+</sup>, il ne compense pas l'inactivation d'AKT1 dans la lignée mutante (Hirsch *et al.*, 1998; Spalding *et al.*, 1999).

Le canal AtKC1 pourrait également être impliqué dans l'absorption de K<sup>+</sup> par la racine. L'analyse du profil d'expression d'une construction chimérique constituée du promoteur d'AtKC1 fusionné à la séquence GUS introduite dans *Arabidopsis* indique que ce canal est exprimé dans les cellules épidermiques et corticales des zones matures des racines et des poils

absorbants (Pilot, 1999), comme AKT1. Cependant, AtKC1 n'a pu être caractérisé dans aucun système hétérologue (ovocyte de xénopé, cellules d'insecte...), et il est difficile de lui attribuer un rôle sans connaître ses propriétés fonctionnelles. Il est toutefois important de remarquer que le canal de carotte KDC1 (AJ249962, Downey *et al.*, sous presse) est très proche d'AtKC1 d'un point de vue phylogénique (*Cf.* figure 1.6), et qu'il a très récemment été caractérisé comme un canal entrant (en systèmes hétérologue et homologue). Il est donc probable qu'AtKC1 soit également un canal d'influx.

### 1.7.3 Régulation de l'absorption racinaire

#### *Effet de la disponibilité du potassium dans le milieu*

Lorsque la disponibilité de  $K^+$  dans le sol est très faible, une situation de carence peut apparaître, provoquant une perturbation des flux de sève, une accumulation des photo-assimilats dans les feuilles, et l'apparition de symptômes de chlorose et de nécrose, qui résultent de l'augmentation de la production d'ions superoxyde (provoquée par la photo-oxydation de l'appareil photosynthétique) (Marschner *et al.*, 1996).

La plante a développé des mécanismes de régulation de l'absorption racinaire lui permettant de s'adapter aux fluctuations de la disponibilité de  $K^+$ . Une augmentation de la capacité d'absorption de  $K^+$  en réponse à une faible disponibilité a été observée chez plusieurs espèces (Glass et Fernando, 1992). Chez le blé, l'orge et l'ivraie, l'efficacité du transport à haute affinité est accrue (Glass et Dunlop, 1978; Kochian et Lucas, 1982; Kochian et Lucas, 1988). Chez *Arabidopsis* et le tournesol, ce sont à la fois les transports de haute et de basse affinité qui sont stimulés (Benlloch *et al.*, 1989; Maathuis et Sanders, 1995).

Les processus aboutissant à cette augmentation des capacités d'absorption ont été recherchés. Il semble d'une part que la concentration cytosolique de  $K^+$  soit à l'origine d'une régulation allostérique sur la capacité d'absorption, par l'intermédiaire d'un "feed-back" négatif exercé sur les transporteurs (Glass, 1977). La levée de ce feed-back en situation de carence serait en partie à l'origine de l'augmentation de la capacité de transport. D'autre part, l'adaptation à la diminution de la disponibilité de  $K^+$  impliquerait une reprogrammation de l'expression génique, se traduisant en particulier par l'apparition de nouveaux polypeptides membranaires (Fernando *et al.*, 1992; Glass et Fernando, 1992). De plus, des analyses par northem blot montrent que les quantités de transcrits *HKT1* (Wang *et al.*, 1998a) et *KUP* (Santa-Maria *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998) augmentent en conditions de faible disponibilité de  $K^+$ . Enfin, les analyses par patch-clamp révèlent une augmentation de l'activité de certains canaux entrants (Maathuis et Sanders, 1995). Cependant, il faut noter que la quantité de transcrits *AKT1* n'est pas augmentée en conditions de carence, bien qu'il ait été démontré que ce canal est impliqué dans l'absorption racinaire du potassium. De plus, la signification

physiologique d'une stimulation de transports passifs en situation de faible disponibilité n'est pas claire. Les mécanismes moléculaires responsables de l'augmentation de la capacité de transport racinaire en situation de carence potassique demandent donc encore à être précisés.

### ***Signalisation feuilles-racines et contrôle de l'absorption racinaire***

Un dialogue entre feuilles et racines, permettant l'intégration des transports à l'échelle de la plante entière, est impliqué dans la régulation de l'absorption de K<sup>+</sup> par les racines. Un ralentissement de la croissance des parties aériennes se traduit en quelques jours par une réduction de la vitesse de prélèvement de K<sup>+</sup> au niveau racinaire (Engels et Marschner, 1992). A l'inverse, un besoin accru de potassium dans les parties aériennes provoque une augmentation de la capacité d'absorption racinaire et un accroissement de la vitesse de transport dans la sève xylémienne (Drew et Saker, 1984). Il semble que la quantité de K<sup>+</sup> dans la sève phloémienne redescendant vers les racines constitue un signal informant les cellules racinaires des besoins en potassium des parties aériennes. La racine modulerait l'absorption du cation en fonction de ce signal (Drew *et al.*, 1984; Cf. § 1.9.2).

## **1.8 Transport du potassium dans la sève xylémienne**

Deux voies permettent la migration des ions du milieu vers la stèle et la sève xylémienne en direction des parties aériennes : la voie apoplasmique, correspondant au réseau des parois squelettiques des cellules, et la voie symplasmique, correspondant au réseau des cytoplasmes en communication par les plasmodesmes (Sjölund, 1997; Thompson et Scuhltz, 1999). Cependant, en dehors des régions apicales indifférenciées et des zones d'émergence des racines secondaires, la voie apoplasmique est interrompue par la différenciation de l'endoderme et les composés pariétaux hydrophobes du cadre de Caspari. Dans ces régions matures, les ions ne peuvent franchir l'endoderme que par la voie symplasmique. De ce fait, les ions doivent être absorbés par les cellules en amont de l'endoderme, avant d'être excrétés dans l'apoplasmme stélaire. Autrement dit, la composition du flux d'ions arrivant dans l'apoplasmme stélaire en provenance du milieu traduit deux contrôles successifs par les transporteurs membranaires, le premier en amont de l'endoderme, au moment de l'absorption et de l'entrée dans le symplasme, et le second en aval de cette barrière, au moment de la sécrétion dans l'apoplasmme stélaire. Les ions sont ensuite transportés vers les parties aériennes par le flux de sève brute, circulant dans les vaisseaux conducteurs du xylème, formés de cellules mortes, réduites au squelette pariétal. Différentes forces permettent l'ascension de la sève : la poussée racinaire, engendrée par la sécrétion d'ions dans la stèle (provoquant une augmentation du potentiel osmotique), la transpiration foliaire (qui engendre une "tension"

dans la "colonne" d'eau qui se déplace dans les vaisseaux du xylème) et les forces de capillarité, importantes dans les derniers éléments fins du xylème (Zimmermann, 1994).

### 1.8.1 Données électrophysiologiques et moléculaires

Les études électrophysiologiques ont été essentiellement menées sur des protoplastes de cellules de stèle de maïs ou d'orge, parce qu'il est possible de séparer facilement le cortex de la stèle chez ces espèces. Les résultats sont similaires chez le maïs et l'orge. Trois grands types de canaux ont été caractérisés : des canaux à rectification entrante, appelés sKIRC (pour stelar K<sup>+</sup> Inwardly Rectifying Channel), des canaux sortants sélectifs de K<sup>+</sup>, appelés sKORC, et des canaux sortants à faible sélectivité ionique, appelés sNORC (pour stelar Non selective Outwardly Rectifying Channels).

Trois canaux de type sKIRC ont été identifiés, se distinguant par leurs caractéristiques électrophysiologiques (Wegner et De Boer, 1997b; De Boer, 1999). Ils se distinguent également des canaux entrants exprimés dans les cellules corticales des racines. En particulier, sKIRC1 est perméant au césium (un bloqueur de la plupart des canaux potassiques, et en particulier de ceux du cortex). De plus, le potentiel d'activation de ce canal n'est pas modifié par la variation du potentiel d'équilibre du potassium E<sub>K</sub>. Les canaux de type sKIRC pourraient intervenir dans l'absorption des ions K<sup>+</sup> excrétés par les cellules du phloème, étape préalable au renvoi de ces ions vers les parties aériennes *via* la sève xylémienne (De Boer, 1999; Cf. § 1.9.2).

Le canal sKORC, caractérisé sur la membrane de protoplastes de cellules stélaires, présente un potentiel d'activation qui varie quand varie le potentiel d'équilibre E<sub>K</sub>, restant ainsi toujours supérieur à E<sub>K</sub>. sKORC présente aussi une perméabilité à Ca<sup>2+</sup>. La conductance macroscopique du canal augmente avec la concentration externe en potassium, suggérant une régulation de type allostérique avec un site senseur de K<sup>+</sup> sur la face extracellulaire de la protéine (De Boer, 1999). Toutes ces caractéristiques sont partagées par le canal SKOR, cloné chez *Arabidopsis* (Gaymard *et al.*, 1998). De plus, le mutant knock-out *skor-1* (inactivation du gène par insertion d'un ADN-T) présente un phénotype de sous-concentration de K<sup>+</sup> dans la sève xylémienne et de sous-accumulation de cet ion dans les parties aériennes (Gaymard *et al.*, 1998). Dans leur ensemble, ces données indiquent que SKOR est impliqué dans la charge du xylème en K<sup>+</sup>, et qu'il constitue probablement chez *Arabidopsis* le pendant des canaux sKORC caractérisés chez le maïs et l'orge.

Le canal sNORC est perméant à la fois aux anions et aux cations (De Boer, 1999). Il pourrait intervenir dans la signalisation systémique, en cas de blessure par exemple. Il contribuerait à propager le signal le long des tissus xylémens sous la forme d'une

dépolarisation de la membrane plasmique, et peut-être d'une modification du potentiel hydrique de la sève xylémienne (De Boer et Wegner, 1997).

### **1.8.2 Régulation de l'activité des canaux potassiques exprimés dans la stèle racinaire**

L'ajout de GTP entraîne une activation des canaux sKIRC1 et 2, suggérant l'intervention de protéines G dans la régulation de l'activité de ces protéines (De Boer et Wegner, 1997; Wegner et De Boer, 1997b). Une augmentation de la teneur cytosolique en  $\text{Ca}^{2+}$  provoque une inhibition du courant potassique conduit par sKORC, et une activation du canal sNORC (De Boer et Wegner, 1997; Wegner et De Boer, 1997a).

Au niveau hormonal, le rôle de l'ABA a été particulièrement étudié. L'ABA semble avoir un rôle activateur des courants sKIRC, et un effet inhibiteur des activités sKORC (Roberts, 1998). Ces données sont à rapprocher de l'effet de l'ABA sur l'accumulation du transcrit *SKOR*. Les analyses par northern blot révèlent qu'un traitement par cette hormone provoque une diminution rapide de l'abondance du transcrit *SKOR*, et sa disparition en moins d'une dizaine d'heures (Gaymard *et al.*, 1998; Pilot, 1999). Cette régulation pourrait avoir comme fonction de réduire le flux de  $\text{K}^+$  dirigé vers les parties aériennes de telle sorte que la racine puisse mieux réguler son équilibre ionique et poursuivre sa croissance en conditions de stress hydrique (Gaymard *et al.*, 1998).

## **1.9 Transport du potassium dans la sève phloémienne**

La sève phloémienne assure la translocation des assimilats des sites de synthèse (organes sources : essentiellement les feuilles matures) vers les sites d'utilisation ou de stockage (organes puits : racines, jeunes feuilles, fleurs et fruits en développement). Le système vasculaire phloémien est constitué de tubes criblés, cellules hautement spécialisées ayant perdu la majorité de leurs organites (noyau, vacuole, réticulum, appareil de Golgi, et chloroplastes). Autrement dit, ces cellules se réduisent à un cytoplasme sans organite. Le flux de métabolites et protéines provenant de cellules dites compagnes, auxquelles elles sont reliées par de nombreux et grands plasmodesmes, les maintient "vivantes" (Sjölund, 1997; Thompson et Schulz, 1999). Le flux de sève dans le tube criblé correspond donc à un flux de masse dans le cytosol de ces cellules. La charge de solutés (principalement saccharose et potassium) dans le phloème au niveau des sources et leur décharge dans les puits provoque un gradient de potentiel osmotique, qui se traduit par un gradient de pression hydrostatique, entre sources et puits, à l'origine du flux de masse vers les puits. La vitesse de ce flux peut être relativement élevée, de l'ordre de plusieurs dizaines de centimètres par heure (Patrick, 1997; Sjölund, 1997; Oparka et Turgeon, 1999).

### 1.9.1 Les systèmes de transport exprimés dans le phloème

La plupart des études consacrées aux transporteurs membranaires impliqués dans la charge et la décharge du phloème se sont focalisées sur les transporteurs de saccharose. Le transporteur StSUT1, identifié chez la pomme de terre et opérant un symport  $H^+$ :saccharose, est impliqué dans l'exportation de ce sucre des feuilles vers les puits (Riesmeier *et al.*, 1994). Il est présent dans les tubes criblés, bien qu'étant synthétisé dans les cellules compagnes (Kühn *et al.*, 1997). Chez *Arabidopsis*, AtSUC2 (symporteur  $H^+$ :saccharose) est exprimé dans le phloème des organes sources et dans celui des puits, suggérant que ce transporteur pourrait avoir des caractéristiques autorisant un fonctionnement tantôt comme un système d'absorption et tantôt comme un système de sécrétion, ce qui lui permettrait d'intervenir à la fois dans la charge et la décharge du phloème en saccharose (Truernit et Sauer, 1995).

La compréhension des mécanismes responsables de l'énergisation de la membrane nécessaire au fonctionnement des transporteurs phloémiens est également un objectif majeur de recherche. Il semble que cette énergisation soit le fait d'une ( $H^+$ )ATPase, probablement codée par le gène AHA3 chez *Arabidopsis* (DeWitt *et al.*, 1991; DeWitt et Sussman, 1995). La protéine AHA3 est retrouvée principalement sur la membrane plasmique des cellules compagnes. Il semble donc que l'énergisation de la membrane plasmique des cellules compagnes se "propage" à la membrane des tubes criblés. On peut imaginer par exemple que les nombreux plasmodesmes qui existent entre ces cellules les rendent isopotentielles (DeWitt et Sussman, 1995). Enfin, AHA3 servirait à l'énergisation des membranes à la fois pour la charge et pour la décharge du phloème, puisque ce système est exprimé à la fois dans les organes sources et dans les organes puits (DeWitt *et al.*, 1991).

En comparaison, le transport de  $K^+$  dans la sève phloémienne a été peu étudié. Des données (électro)physiologiques suggèrent qu'un gradient de  $K^+$  existe le long du système vasculaire et qu'il a une grande importance dans la formation du gradient de potentiel osmotique qui dirige le flux de sève des sources vers les puits (Cf. ci-dessus; Mengel et Haeder, 1977). D'autre part, il a été proposé que la teneur de  $K^+$  dans la sève phloémienne serait en relation avec l'abondance de cet ion dans les feuilles, et constituerait ainsi un signal permettant d'informer les racines du besoin des parties aériennes en  $K^+$  (§ 1.9.2; Drew et Saker, 1994; Marschner *et al.*, 1996). Les connaissances moléculaires concernant les flux de  $K^+$  dans le phloème ont considérablement augmenté avec le clonage et la caractérisation d'AKT2 (Marten *et al.*, 1999; Lacombe *et al.*, 2000). Ce canal est doté d'une faible rectification entrante. Il est ouvert pour une large gamme de potentiels. Ses caractéristiques électrophysiologiques et sa localisation dans les tissus phloémiens des sources et des puits (Lacombe *et al.*, 2000) suggèrent qu'il serait impliqué à la fois dans la charge et la décharge de  $K^+$  dans le phloème, au niveau des sources et des puits respectivement. Un tel double rôle évoque celui prêté à AtSUC2.

### **1.9.2 Transport phloémien et re-circulation de K<sup>+</sup> dans la plante**

Les ions K<sup>+</sup> déchargés dans les feuilles matures par la sève xylémienne sont en grande partie redirigés vers le phloème (Marschner *et al.*, 1996). Les analyses faites chez le soja indiquent que 65 % du potassium arrivant aux feuilles est renvoyé aux racines. Le flux phloémien d'ions K<sup>+</sup> arrivant dans la stèle racinaire en provenance des parties aériennes peut être supérieur à celui des ions prélevés dans le sol par le cortex racinaire et sécrétés dans la stèle (Touraine *et al.*, 1988). Ce mécanisme de recirculation entre feuilles et racines est supposé jouer un rôle majeur dans le contrôle des transports racinaires de K<sup>+</sup> et l'intégration des flux à l'échelle de la plante entière (Drew *et al.*, 1984). Une augmentation du flux de K<sup>+</sup> arrivant aux racines par la sève phloémienne constituerait un signal informant la racine que la demande en potassium des parties aériennes a diminué. Ce signal aurait un effet négatif sur la sécrétion de K<sup>+</sup> dans le xylème par les cellules du parenchyme xylémien, provoquant une augmentation de la concentration de cet ion dans le symplasme stélaire puis cortical, et ainsi à une rétro-inhibition de la vitesse de prélèvement (Drew *et al.*, 1984).

## **1.10 Les flux de potassium dans la cellule de garde**

### **1.10.1. Mouvements stomatiques et canaux potassiques**

Les stomates sont des structures présentes sur l'épiderme des organes aériens de la plante, dont la fonction est de contrôler les échanges gazeux (fixation de CO<sub>2</sub>, perte de vapeur d'eau) avec l'atmosphère. Chaque stoma est composé de deux petites cellules en forme de haricot : les cellules de garde. Entre ces deux cellules est ménagé un pore, l'ostiole. C'est par l'ostiole que se font les échanges gazeux entre les tissus sous-épidermiques et l'atmosphère.

La paroi de la cellule de garde n'a pas la même épaisseur sur tout le pourtour de la cellule : elle est plus épaisse dans la région en regard de l'ostiole que sur la face opposée. De plus, les parois des deux cellules formant le stoma sont disjointes en regard de l'ostiole (ménageant l'ouverture) et soudées aux points de jonction de part et d'autre de l'ostiole. Cette organisation fait que des variations de la turgescence des cellules de garde provoquent des variations du diamètre de l'ostiole. Plus précisément, une augmentation de la turgescence conduit à une plus grande ouverture du pore. Réciproquement, une diminution de la turgescence provoque la fermeture du pore. C'est par la régulation de l'ouverture et de la fermeture des stomates que la plante contrôle ses échanges gazeux.

Les variations de turgescence des cellules de garde sont engendrées par des échanges rapides et massifs de solutés entre l'apoplasm et les compartiments vacuolaire et cytoplasmique. Ces solutés sont essentiellement des ions inorganiques, K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>, et du malate.

Des canaux présents sur le plasmalemme et le tonoplaste permettent ces échanges (Assman, 1993; Assman, 1999). Par exemple, lors de la fermeture du stomate, plus de la moitié des solutés osmotiquement actifs de la vacuole sont excrétés dans le cytoplasme, puis dans l'apoplasm (McRobbie, 1998). Une partie du malate reste dans le cytoplasme. Il est métabolisé en amidon (Assman, 1993; Assman, 1999).

Les canaux cationiques et anioniques responsables de ces transports sur le tonoplaste et les canaux anioniques sur le plasmalemme ont été caractérisés par des expériences de patch-clamp sur vacuole isolée ou protoplaste, mais aucun d'entre eux n'a encore été identifié au niveau moléculaire. Seuls des canaux potassiques plasmalemiques ont été clonés à ce jour. L'analyse des caractéristiques fonctionnelles et du profil d'expression de KAT1 appuient l'hypothèse d'un rôle de ce canal dans l'influx de  $K^+$  lors de l'ouverture du stomate. Cette hypothèse est confortée par une approche de type génétique inverse: la sur-expression d'un canal KAT1 mutant altéré dans sa sensibilité à  $Cs^+$  se traduit par une modification de la sensibilité de l'ouverture stomatique à cet ion (Ichida *et al.*, 1997). Des données obtenues dans notre équipe suggèrent cependant que KAT1 n'est pas le seul canal impliqué dans le flux entrant de  $K^+$  chez *Arabidopsis*: le canal KAT2 est également exprimé dans la cellule de garde et ses caractéristiques fonctionnelles sont très semblables à celles de KAT1 et des canaux entrants caractérisés sur la membrane des cellules de garde. Des expériences de co-expression dans l'ovocyte de xénophage et des analyses à l'aide de la technique du double-hybride dans la levure indiquent de plus que les polypeptides KAT1 et KAT2 peuvent interagir et former des canaux hétéromériques (Pilot *et al.*, soumis). Nous ne savons pas encore si ces interactions, détectées en système hétérologue, se produisent et ont une signification physiologique *in planta*. Le(s) canal(aux) permettant l'efflux de  $K^+$  lors de la fermeture du stomate n'a(ont) pas encore été identifié(s) de manière certaine. Néanmoins, nous disposons au laboratoire de données suggérant fortement que le canal SKOR2 est impliqué dans cette fonction chez *Arabidopsis* (Gaymard et Lacombe, communication personnelle).

### 1.10.2. Régulation de l'activité des canaux potassiques de la cellule de garde

L'ouverture des stomates est régulée par les facteurs environnementaux, dont la teneur en  $CO_2$ , les lumières rouge et bleue, et les hormones, principalement l'auxine et l'ABA. La régulation négative par l'ABA joue un rôle majeur dans l'adaptation de la plante au stress hydrique. L'élucidation des mécanismes responsables de cette régulation constitue un des objectifs prioritaires des physiologistes. Cela fait de la cellule de garde, et de sa réponse à l'ABA, le modèle d'analyse de la transduction des signaux le plus utilisé chez les plantes.

Le contrôle par l'ABA s'exerce à la fois *via* une régulation de la  $H^+$ -ATPase de la membrane plasmique et donc de la polarisation membranaire, et une régulation de l'activité des canaux (MacRobbie, 1998). La conductance potassique majeure entrante sur le

plasmalemme correspond à un canal activé par l'hyperpolarisation, s'ouvrant à des potentiels inférieurs à environ -100 mV. Elle est inhibée par une augmentation de la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  et une alcalinisation du cytoplasme, toutes deux provoquées par l'ABA et par l'IP<sub>3</sub> (Inositol 1,4,5-triphosphate) (Blatt *et al.*, 1990; Armstrong et Blatt, 1995). Il a été montré que l'injection d'IP<sub>3</sub> provoque une augmentation de la concentration cytosolique de  $\text{Ca}^{2+}$  conduisant à une fermeture du stomate (Blatt *et al.*, 1990; Gilroy *et al.*, 1990). On imagine que l'IP<sub>3</sub> participe à la transduction du signal provoquant la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  en réponse à l'ABA. Très récemment, il a été aussi montré que l'ABA déclenche la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les cellules de garde, et que cette dernière molécule active des canaux calciques entrants (Pei *et al.*, 2000). Les processus intervenant en aval du signal calcique sont plus flous. La calcineurine (Luan *et al.* 1993), des protéines G et des récepteurs à 7 segments transmembranaires (Fairley-Grenot et Assmann, 1991; Armstrong et Blatt, 1995) sont supposés faire partie de la cascade de régulation de la conductance potassique entrante par l'ABA. D'autre part, les mutations *abi1* et *abi2*, affectant des phosphatases 2C (Leung *et al.*, 1994; Bertauche *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 1998), provoquent une réduction de la sensibilité du canal entrant à l'ABA (Armstrong *et al.*, 1995; Pei *et al.*, 1997). Cependant, aucune donnée ne permet de savoir si les kinases et phosphatases en jeu agissent directement sur le canal ou sur des protéines les régulant.

La fermeture des stomates fait intervenir une conductance potassique sortante, qui est le fait d'un canal s'activant à des potentiels plus positifs que  $E_K$ . L'ABA favorise l'efflux de  $\text{K}^+$  en provoquant une dépolarisation de la membrane ainsi qu'une alcalinisation du cytoplasme qui stimule l'activité du canal sortant (Blatt et Armstrong, 1993). Il a aussi été constaté que la mutation *abi1* affecte la sensibilité du canal sortant à l'ABA (Pei *et al.*, 1997).

Les données concernant les mécanismes impliqués dans la régulation de l'ouverture stomatique sont encore trop fragmentaires pour permettre l'élaboration d'un modèle interprétatif. Cependant, la complexité des intervenants et des phénomènes en jeu suggère, d'ores et déjà, que plusieurs voies de transduction de signaux, partageant des éléments communs, sont mises en place pour aboutir au contrôle des mouvements stomatiques.

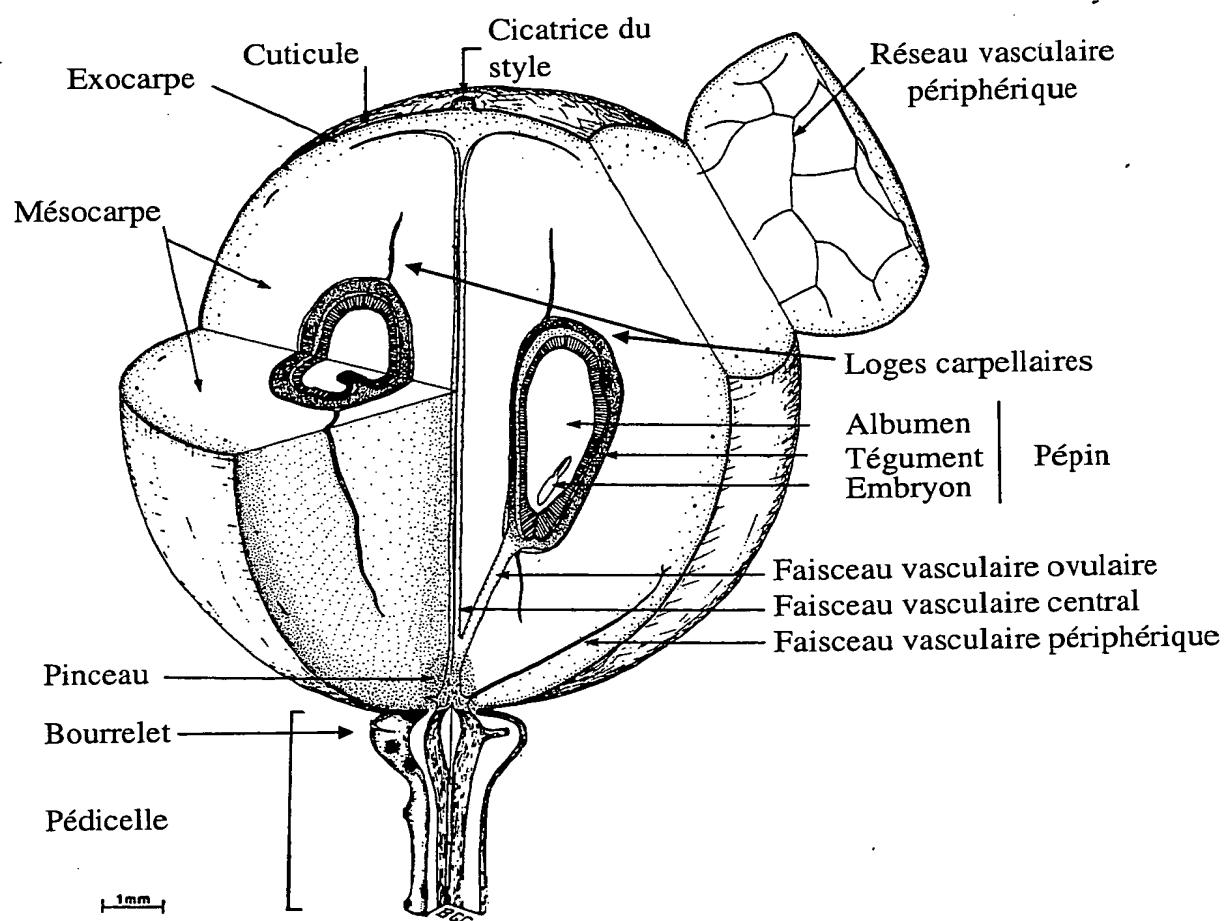


Figure 1.7 : représentation schématique d'une baie (d'après Coombe, 1987).

## **1.11 Biologie générale des fruits de la vigne**

La vigne est une liane appartenant à la famille des Vitacées et à l'ordre des Rhamnales. Le genre *Vitis* est subdivisé en trois groupes : euro-asiatique, asiatique et américain. Le groupe euro-asiatique ne comporte en fait qu'une seule espèce identifiée : *Vitis vinifera* L., qui comprend des milliers de variétés (ou cultivars, cépages) relativement difficiles à classer. La plupart des variétés cultivées pour la production de raisin de table ou de cuve appartiennent à l'espèce *vinifera*. Les groupes asiatique et américain sont composés d'un plus grand nombre d'espèces. Depuis la crise phylloxérique en Europe, les porte-greffes utilisés en viticulture sont issus de croisements interspécifiques à l'intérieur du groupe américain, ou entre *vinifera* et ces espèces américaines.

### **1.11.1 Morphogenèse et structure de la baie**

Les organes reproducteurs de la vigne sont organisés en inflorescences. Les différentes pièces florales se différencient entre le débourrement et la floraison. L'ovaire est constitué de deux carpelles soudés au niveau de la columelle, chaque loge carpellaire renfermant deux ovules anatropes. La vascularisation de l'ovaire apparaît au moment de la méiose, environ 3 semaines avant la floraison.

La fécondation a lieu quelques jours après l'anthèse, la pollinisation étant essentiellement autogame. Les quatre ovules de la fleur sont rarement tous fécondés, on ne trouve en moyenne que deux pépins par baie. Généralement, une partie des fleurs d'une inflorescence ne donne pas de baies. Une dizaine de jours après la floraison, le pédicelle d'un certain nombre d'organes se détache de la rafle au niveau d'une zone d'abscission (Bessis et Fournioux, 1992). La raison de cette abscission (absence de fécondation, avortement), n'est pas claire. Lorsque les fleurs sont fécondées, les ovaires et les ovules évoluent respectivement en baies et graines (pépins), tandis que les rafles s'épaissent et se transforment en bois. A maturité, les rafles ne représentent que 5 % environ du poids total frais de la grappe.

Les baies sont des fruits charnus. Ce type de fruit est caractérisé par une importante accumulation d'eau et souvent de sucres au cours de leur développement. Chez la vigne, la partie charnue de la baie (ou péricarpe) dérive de la totalité des tissus constituant les parois de l'ovaire. Le péricarpe se compose de trois tissus : l'exocarpe (ou pellicule, peau), le mésocarpe (pulpe ou chair) et l'endocarpe (figure 1.7) (Pratt, 1971).

- l'exocarpe est composé d'une assise de cellules épidermiques (6,5 à 10 µm d'épaisseur), et d'une couche de cellules hypodermiques (100 à 250 µm d'épaisseur).
- les cellules de la pulpe sont de grande taille, plutôt sphériques. Leur vacuole occupe la majeure partie du compartiment cellulaire. Au cours du développement, ces cellules grossissent, et peuvent atteindre 400 µm de diamètre.

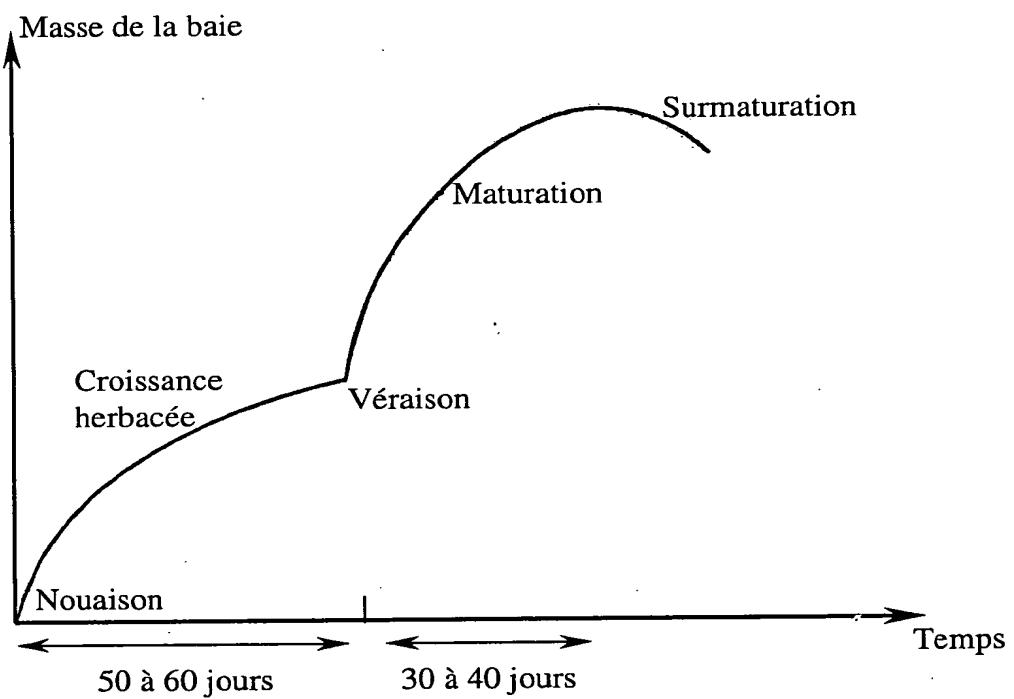


Figure 1.8: les phases de la maturation de la baie.

La croissance est représentée par l'évolution de la masse de la baie en fonction du temps (en jour).

- l'endocarpe est la région la plus interne du fruit. Elle se situe à la limite des loges carpellaires contenant les pépins.

Lorsque les baies se développent, la proportion des différents tissus varie (Park, 1995). L'hypoderme s'amincit, ses cellules évoluent en cellules de la pulpe. L'épaisseur des parois cellulaires diminue graduellement (Fougère-Rifot *et al.*, 1996), sans que cela affecte l'intégrité des cellules.

La vascularisation de la baie dérive de celle de l'ovaire (Pratt, 1971). Elle est constituée d'une part d'un réseau de petits faisceaux périphériques, situés à une vingtaine d'assises cellulaires au-dessous de l'épiderme. D'autre part, un large faisceau vasculaire central alimente les pépins et la columelle. Ces faisceaux se rejoignent au sommet de la baie en un "pinceau" qui s'ancre au niveau du bourrelet du pédicelle, ce dernier constituant la dernière ramification de la rafle. Au début du développement, les faisceaux vasculaires périphériques symbolisent la limite entre exocarpe et mésocarpe. Plus tard, ils sont entourés de cellules de la pulpe et sont donc partie intégrante de ce tissu (Park, 1995).

### **1.11.2 Aspects généraux du développement de la baie**

Après la fécondation des fleurs, on distingue classiquement trois stades principaux dans le développement des baies : le stade herbacé, la véraison et la maturation, qui dessinent une courbe de croissance en double sigmoïde (figure 1.8).

Après la fécondation de la fleur, seul l'ovaire persiste pour donner le grain de raisin, tandis que les ovules évoluent en pépins. Un ovaire commençant à se développer est dit noué. Le terme décrivant ce phénomène au niveau de la grappe est "nouaison".

#### ***Le stade herbacé***

A partir de la nouaison, les jeunes baies sont dans le "stade herbacé". Elles grossissent jusqu'à atteindre la taille d'un petit pois. Cette augmentation de taille est initialement le fait de divisions mitotiques rapides (Coombe, 1976) dont le pic se situe environ une semaine après l'anthèse (Jona et Botta, 1988). Une période de gonflement cellulaire se déroule alors, la baie augmente son volume d'un facteur 300 environ (Coombe, 1976). Ce grossissement est principalement lié à une forte accumulation d'eau et d'acides organiques, notamment d'acides malique et tartrique, dans la vacuole des cellules du péricarpe. Le pH du jus, représentatif du pH de la vacuole du fait du volume relatif de ce compartiment, est voisin de 2,5 (Hrazdina *et al.*, 1994), et reste constant au cours de cette phase herbacée. Enfin, la concentration en sucres est très faible pendant cette phase.

Pendant ce stade, les baies sont chlorophylliennes, et capables de photosynthèse, mais leur respiration est intense et le bilan de CO<sub>2</sub> est toujours négatif (Leyhe et Blanke, 1989). Les baies possèdent des stomates fonctionnels, mais relativement peu nombreux. Leur nombre varie d'une à quelques dizaines par baie en fonction des variétés (Blanke et Leyhe, 1987). Les pertes transpiratoires, importantes à ce stade, ont donc probablement lieu principalement à travers l'épiderme (*Cf.* §1.12.4).

La fin du stade herbacé se traduit par un fort ralentissement de la croissance, qui est appelé "plateau herbacé".

### ***La véraison***

La véraison marque la transition entre le plateau herbacé et l'induction du mûrissement (figure 1.8). Elle se traduit par un ramollissement très rapide des baies, en 24 h environ. Cependant, l'état des baies étant hétérogène, la véraison de toutes les baies d'une parcelle peut s'étendre sur trois semaines. Le grain, initialement vert et dur, devient translucide chez les cépages blancs, ou prend une teinte violacée chez les cultivars colorés. On suppose aujourd'hui que les chlorophylles ne sont pas dégradées, mais sont simplement masquées par d'autres pigments (Park, 1995). La baie n'est donc plus photosynthétique. Les stomates évoluent en lenticelles. Les cavités sous-stomatiques sont colmatées par une accumulation de subérine, de polyphénols, de calcium et de silice (Blanke, 1999). De profondes modifications biochimiques s'amorcent, ainsi qu'un accroissement du volume cellulaire.

### ***La maturation***

Dès le début de la phase de maturation, les baies recommencent à grossir (figure 1.8), et accumulent des hexoses (glucose et fructose) importés par le phloème. Ces sucres constituent l'osmoticum principal permettant le gonflement du fruit (Champagnol, 1984). Leur concentration peut atteindre 1 mol.l<sup>-1</sup> à maturité (Coombe, 1987). De plus, l'acidité se réduit, le pH remonte à des valeurs proches de 3,5, et la concentration des acides organiques diminue.

La maturité physiologique correspond au moment où les baies ont atteint leur plus grand diamètre et leur taux de sucre maximal. Lorsque les baies sont laissées sur pied plus longtemps, elles entrent dans une période de surmaturation, et vivent sur leurs réserves. Elles perdent de l'eau, leur jus se concentrant ainsi, ce qui peut être favorable à leur utilisation ultérieure.

## **1.12 Aspects physiologiques et biochimiques de la maturation des baies**

Au cours de son développement, la baie passe par des phases de changements drastiques de sa physiologie et de sa composition biochimique. Pour arriver à maturation, ses parois se ramollissent, sa pulpe s'enrichit en composés arômatiques et en glucides, tandis que son acidité se réduit. Les principaux aspects de cette maturation sont détaillés ci-dessous.

### **1.12.1 Modifications structurales**

#### *Ramollissement des baies : modifications pariétales*

Les cellules du mésocarpe subissent des modifications structurales importantes dès la véraison (Harris *et al.*, 1968). Le ramollissement est lié à une diminution de la concentration en substances pectiques (Silacci et Morrison, 1990) et en calcium et à l'activité d'enzymes dégradant les parois cellulaires (Donèche et Chardonnet, 1992).

Le ramollissement des fruits a été corrélé à une réduction de la concentration cellulaire en pectine, notamment chez la poire (Bartley *et al.*, 1982). Il a été montré que la concentration des pectines dans la baie de raisin diminue au cours de sa maturation (Roberston *et al.*, 1980), notamment du fait de la croissance très rapide de la taille des cellules de la pulpe. Cela aboutit à la désorganisation de la structure des parois cellulaires (Donèche et Chardonnet, 1992) et en conséquence à un assouplissement des tissus.

Donèche et Chardonnet (1990) ont également observé un transfert du calcium des cellules de la pulpe vers les parois des cellules de l'exocarpe. Il va permettre à ce niveau une meilleure cohésion des parois, et ralentir la sénescence des cellules épidermiques (Brady, 1987). Cela permet d'établir un "squelette externe" qui maintient la cohésion de la baie et favorise la résistance aux parasites. En revanche, au niveau des cellules de la pulpe, la réduction de la teneur en calcium ajoutée à la réduction de la concentration en pectines va favoriser la solubilisation de la lamelle moyenne par action d'enzymes pectinolytiques. Deux activités pectinolytiques ont été caractérisées chez la baie : la pectine méthylestérase, qui déméthyle les groupes uroniques estérifiés de l'acide galacturonique, et dont l'activité double pendant la maturation, et la polygalacturonase, qui coupe uniquement entre les résidus d'acides galacturoniques déméthylés et qui intervient donc à la suite de la pectine méthylestérase.

#### *Modifications du système vasculaire xylémien et de l'apport des solutés vers la baie*

\* Mise en évidence de discontinuités du xylème

Il y a une dizaine d'années, il a été observé que le flux xylémien s'interrompt, du fait de l'apparition de discontinuités dans les tissus xylémiens. Ces ruptures apparaissent aux

alentours de la véraison (Düring *et al.*, 1987; Findlay *et al.*, 1987), et interviennent au niveau du pinceau. Elles ont été mises en évidence par l'utilisation de colorants apoplastiques (Creasy *et al.*, 1993) et par des mesures de flux hydriques (Ollat, 1997).

Ces discontinuités avaient été associées à la croissance rapide des baies au moment de la véraison (Düring *et al.*, 1987; Findlay *et al.*, 1987). Cependant, Creasy *et al.* (1993) ont montré que les ruptures chez le Pinot noir et le Merlot ont lieu lorsque la baie se ramollit, ce qui se produit quelques jours avant la croissance rapide. La rupture du xylème semble donc finalement résulter d'un autre phénomène qu'un étirement des vaisseaux dû à la croissance cellulaire. Une rupture de la compartimentation cellulaire, liée à la fragilisation des parois, est évoquée par certains auteurs (Lang et Düring, 1991; Creasy *et al.*, 1993).

#### \* Modification de l'apport des solutés vers les baies

La conséquence des ruptures xylémiques apparaissant aux alentours de la véraison est une modification de l'approvisionnement des baies en solutés et en eau. En effet, l'essentiel de ces flux est alors pris en charge par les vaisseaux du phloème. Cependant, la sève phloémienne, riche en divers composés du métabolisme secondaire, comporte moins d'acides organiques, mais plus de sucres, que la sève xylémienne (Coombe, 1992). Ce changement d'approvisionnement pourrait en partie expliquer l'évolution de la composition des baies en acides organiques, sucres et eau après la véraison (*Cf.* paragraphes suivants).

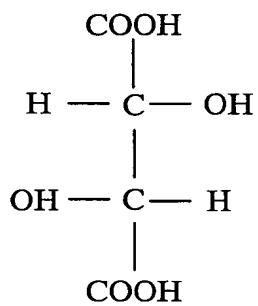
### 1.12.2 Flux d'acides organiques

#### *Acidité de la baie*

Le raisin est un fruit particulièrement acide. Son pH passe de 2,5 à la véraison à 3,5 environ à la vendange. Les acides organiques accumulés sont élaborés essentiellement dans les feuilles. Environ 90 % de l'acidité de la baie sont dus aux acides malique et tartrique, dont les concentrations peuvent atteindre 30 à 50 mmol.l<sup>-1</sup> en fin de maturation (Winkler *et al.*, 1974). D'autres acides sont détectés dans les baies, mais à des concentrations bien inférieures : acide citrique (jusqu'à 10 mmol.l<sup>-1</sup> chez certains cultivars), acides succinique et fumarique (moins de 1 mmol.l<sup>-1</sup>). Il est important de noter que les taux d'acide tartrique dans la baie sont remarquables, car cette molécule est fort peu représentée dans le règne végétal.

L'acide malique et l'acide tartrique, qui représentent les deux acides organiques principaux, sont en partie à l'état libre et en partie sous forme de sels combinés au potassium, au calcium, au sodium et au magnésium. Le potassium, en tant que cation majoritaire des cellules, est le principal contre-ion de ces acides. Cependant, il a été remarqué que le calcium est également très utilisé pour la neutralisation du tartrate (Storey, 1987).

A



B

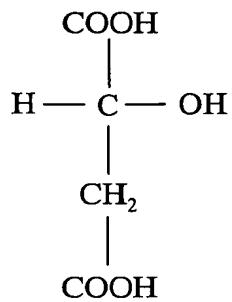


Figure 1.9 : formules chimiques de l'acide tartrique et de l'acide malique.

A. Acide tartrique

B. Acide malique

Les acides malique et tartrique ont des profils d'accumulation très différents, malgré leur structure chimique proche (figure 1.9). L'acide malique est l'objet d'un métabolisme très actif dans la majorité des organes, et il est mobile. Au contraire, l'acide tartrique s'accumule dans les tissus où il est produit; il est peu mobile et peu métabolisé (*Cf.* récapitulatif de la figure 1.11). Comme il est l'acide le plus fort du raisin, sa concentration a une grande influence sur le pH du vin. D'un point de vue technologique, le rapport acide tartrique/acide malique est un facteur important pour la qualité des vins. Un excès de malate par rapport au tartrate provoque une alcalinisation importante du vin après fermentation malolactique, et par conséquent une mauvaise stabilité physique et biologique. De plus, si cette fermentation malolactique est évitée, la présence de malate induit aussi une forte instabilité du vin. Ces altérations du vin peuvent être évitées par diverses interventions œnologiques (sulfitage, ultrafiltration stérile, adjonction d'acide tartrique), mais les législations tendent à limiter la multiplication de ces interventions.

Parmi les facteurs influençant le rapport acide tartrique/acide malique, la nature du cépage a un rôle important. Certains cultivars (Chasselas, Sémillon) accumulent relativement plus de tartrate que d'autres (Pinot noir) (Ruffner, 1982a). D'autre part, les conditions du milieu et de culture vont également moduler ce rapport. En particulier, une fertilisation potassique importante provoque un enrichissement des baies en malate (Hale, 1977; Morris *et al.*, 1983), aux dépens du tartrate (Delas, 1989).

### ***Métabolisme de l'acide tartrique***

La synthèse de l'acide tartrique se produit dans les organes jeunes, qui sont le siège de divisions cellulaires. Elle est donc souvent reliée à la croissance des tissus (Saito et Kasai, 1968).

Les voies de synthèse de l'acide tartrique sont encore mal connues. Il est suggéré depuis assez longtemps que le glucose et le glycolate pourraient en être les précurseurs (Peynaud et Ribéreau-Gayon, 1971; Ruffner, 1982a). Maroc (1967) a effectivement défini deux voies métaboliques de synthèse de l'acide tartrique. La première débute au niveau du glucose et produit de l'acide L(+) tartrique. La seconde fait intervenir la condensation de deux molécules de glycolate pour former de l'acide D(-) tartrique, *via* la réduction d'oxaloacétate. Enfin, l'acide ascorbique a aussi été identifié comme précurseur de l'acide tartrique (Saito et Kasai, 1969).

Des voies de métabolisation de l'acide tartrique ont été recherchées sans mettre en évidence de réelle remobilisation. Le tartrate est stocké dans des "idioblastes", cellules spécialisées dans cette fonction dans les feuilles. Pendant longtemps, on a cru que les aiguilles cristallines ("raphides") observées dans ces cellules et dans les baies étaient des sels

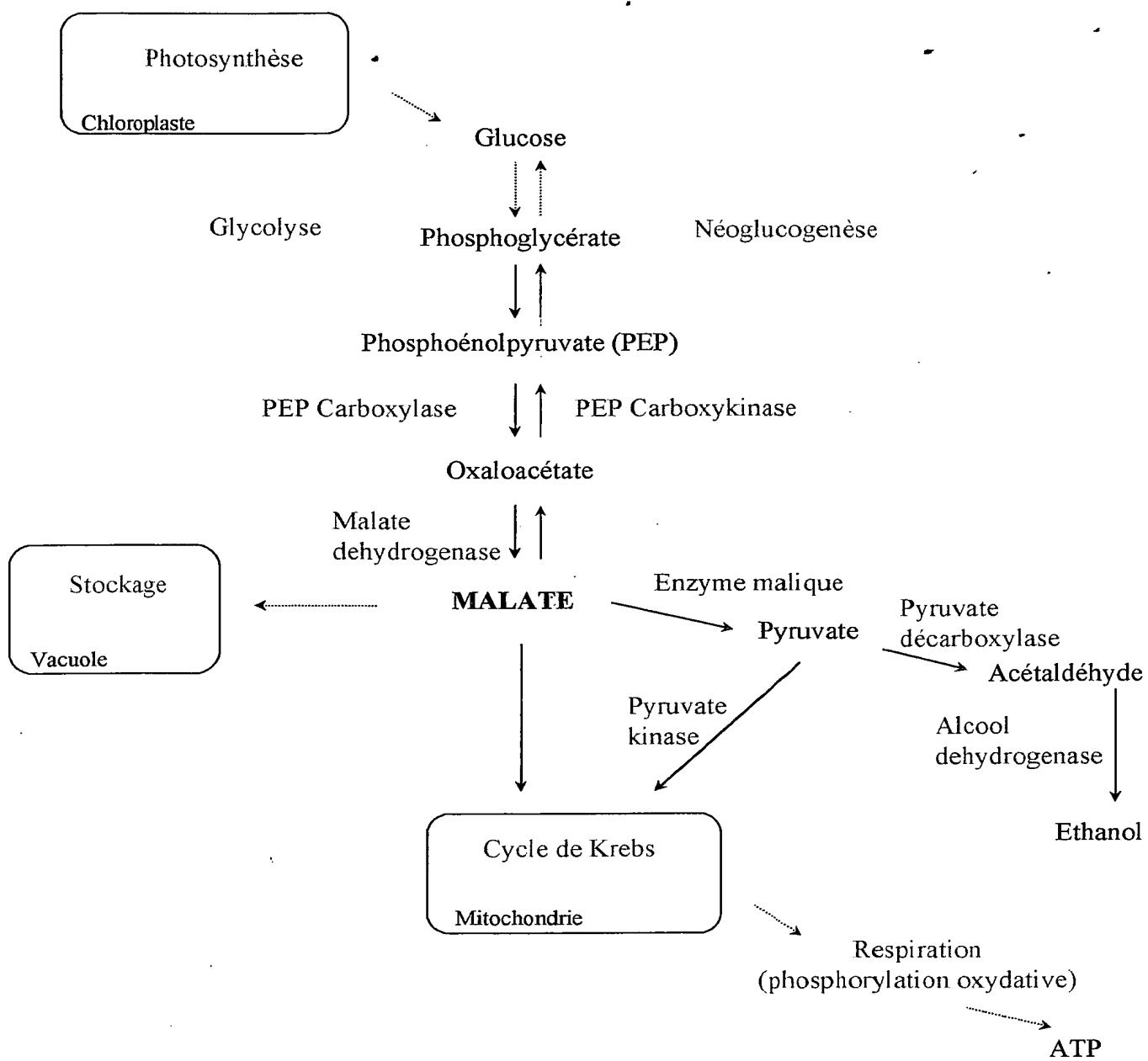


Figure 1.10 : voies de synthèse, stockage et dégradation de l'acide malique (d'après Ruffner, 1982b; Kanellis et Roubelakis-Angelakis, 1993).

Les flèches en pointillés indiquent que plusieurs étapes réactionnelles ont lieu entre les deux composés entre lesquelles elles ont placées. Les flèches en traits pleins indiquent une transition directe. Les noms des enzymes sont en rouge. Les ensembles de réactions biochimiques sont en vert.

potassiques de bitartrate, mais Storey (1987) a démontré qu'il s'agit en fait de cristaux de tartrate de calcium. Cette observation est supportée par les résultats de Hale (1977), qui suggèrent qu'il n'existe pas de corrélation entre les teneurs en potassium et en acide tartrique dans les baies.

La répartition de l'acide tartrique n'est pas homogène dans la baie. Au cours de la maturation, sa concentration dans la pulpe diminue, à cause de l'augmentation du volume de la baie, mais sa quantité par baie reste relativement constante (Ruffner, 1982a). En revanche, sa teneur dans la peau augmente, ainsi que dans les assises de mésocarpe à proximité du réseau vasculaire dorsal (Storey, 1987; Iland et Coombe, 1988).

### ***Métabolisme de l'acide malique***

La voie de synthèse de l'acide malique dans les baies débute à partir du phosphoénolpyruvate (PEP) issu de la glycolyse. Il est soumis à une  $\beta$ -carboxylation par la PEP carboxylase, et l'acide oxaloacétique ainsi formé est réduit en malate par la malate déshydrogénase (figure 1.10).

Avant la véraison, la baie est photosynthétique. Elle peut alors produire des sucres servant à la synthèse d'acide malique. Ce dernier est stocké essentiellement dans la pulpe (mésocarpe interne et externe), et reste peu représenté dans la peau. Il peut s'accumuler jusqu'à des concentrations proches de 200 mM à la véraison (Ruffner *et al.*, 1984). En revanche, après la véraison, l'acide malique s'accumule dans l'exocarpe, et sa teneur diminue fortement dans la pulpe, où sa concentration retombe à 40 mmol.l<sup>-1</sup> environ. Une des conséquences de la réduction du taux d'acide malique est une élévation du pH de la baie. Cette réduction à partir de la véraison est accompagnée d'un influx massif de sucres dans la baie (*Cf.* § suivant). Pour certains auteurs, l'acide malique constitue un pouvoir réducteur stockable, et sa mobilité extra- et intracellulaire permet de transférer ce pouvoir réducteur dans les divers compartiments cellulaires (Ruffner et Hawker, 1977), où il est utilisé après la véraison.

De nombreux auteurs ont étudié le devenir de l'acide malique des baies après la véraison. A l'inverse du tartrate, l'acide malique n'est pas stocké mais utilisé par la baie. Deux voies principales peuvent expliquer sa disparition. La première le fait partir vers la voie de la néoglucogenèse, avec intervention en particulier de la PEP carboxykinase. Le défaut de cette hypothèse est que les processus biochimiques de la néoglucogenèse présentent un optimum à 20°C, alors qu'il a été observé que la chaleur favorise la disparition de l'acide malique dans les baies (Kliewer *et al.*, 1972). La seconde voie métabolique pouvant expliquer la disparition de l'acide malique est la voie de la respiration. Dans ce cas, il est dégradé en pyruvate par l'enzyme malique. L'augmentation du quotient respiratoire de la baie en cours de maturation bien au-delà de 1 est en faveur de cette hypothèse, et fait de la respiration la principale voie de

dégradation du malate (Ruffner, 1982b). L'activité de l'enzyme malique augmente légèrement à partir de la véraison (Ruffner, 1982b), mais aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre l'activité de cette enzyme et la diminution des concentrations en acide malique (Hawker, 1969), ni temporellement (*i.e.* au cours du développement de la baie), ni spatialement (*i.e.* répartition entre les différents tissus de la baie) (Guttiérrez-Granda et Morrison, 1992). Hawker (1969) suggère pour expliquer la respiration de l'acide malique, que l'enzyme malique et son substrat seraient localisés dans des compartiments cellulaires différents (vacuole, cytoplasme), et qu'une augmentation de la perméabilité membranaire à la véraison permettrait alors le contact de l'acide malique et de l'enzyme malique. Cependant, les analyses structurales (microscopie électronique; Hardie *et al.*, 1996; Fillion, 1997) montrent que les membranes des organites et des vacuoles restent intègres jusqu'à la maturité. De plus, le stockage vacuolaire des sucres semble se faire sans les "fuites" que l'on attendrait de la part d'un tonoplaste à la perméabilité augmentée. L'éventuelle augmentation de la perméabilité membranaire ne résulterait donc pas d'une altération générale des membranes mais pourrait être spécifique du malate. Le mécanisme de respiration de l'acide malique pendant la maturation suggéré par Hawker (1969) reste en définitive largement controversé.

### 1.12.3 Flux de sucres

De nombreux glucides s'accumulent dans les baies. Les plus importants sont les hexoses, sucres fermentescibles qui donneront de l'éthanol sous l'action des levures. Les vins non chaptalisés titrant environ 12 % d'alcool (v/v) proviennent de la fermentation de moûts dont la concentration en sucres est d'environ 200 g.l<sup>-1</sup>, soit 1,1 M dans les baies.

Dans une baie mature, le glucose et le fructose sont présents en quantités équivalentes (80 à 120 g.l<sup>-1</sup> de moût) et représentent 99 % des sucres solubles (Winckler *et al.*, 1974). Le saccharose n'est présent qu'en faible proportion (quelques g.l<sup>-1</sup>). Enfin, des sucres non fermentescibles sont présents à l'état de traces : galactose, ribose, xylose, ainsi que des pentoses (arabinose, rhamnose).

Le raisin accumule peu d'amidon dans les stades verts, à l'inverse des fruits climactériques. La baie est donc tributaire pour sa maturation des importations de sucres en provenance du bois et des feuilles.

La répartition du fructose et du glucose n'est pas homogène dans tous les tissus de la baie. Il semble que les hexoses soient en concentrations plus élevées dans la partie médiane des baies, tandis que le saccharose est plus concentré dans l'exocarpe (Possner et Kliewer, 1985; Coombe, 1987).

Lorsque les baies sont au stade vert, très peu de sucres sont stockés, la quantité de fructose étant environ deux fois inférieure à celle du glucose. L'essentiel des sucres importés

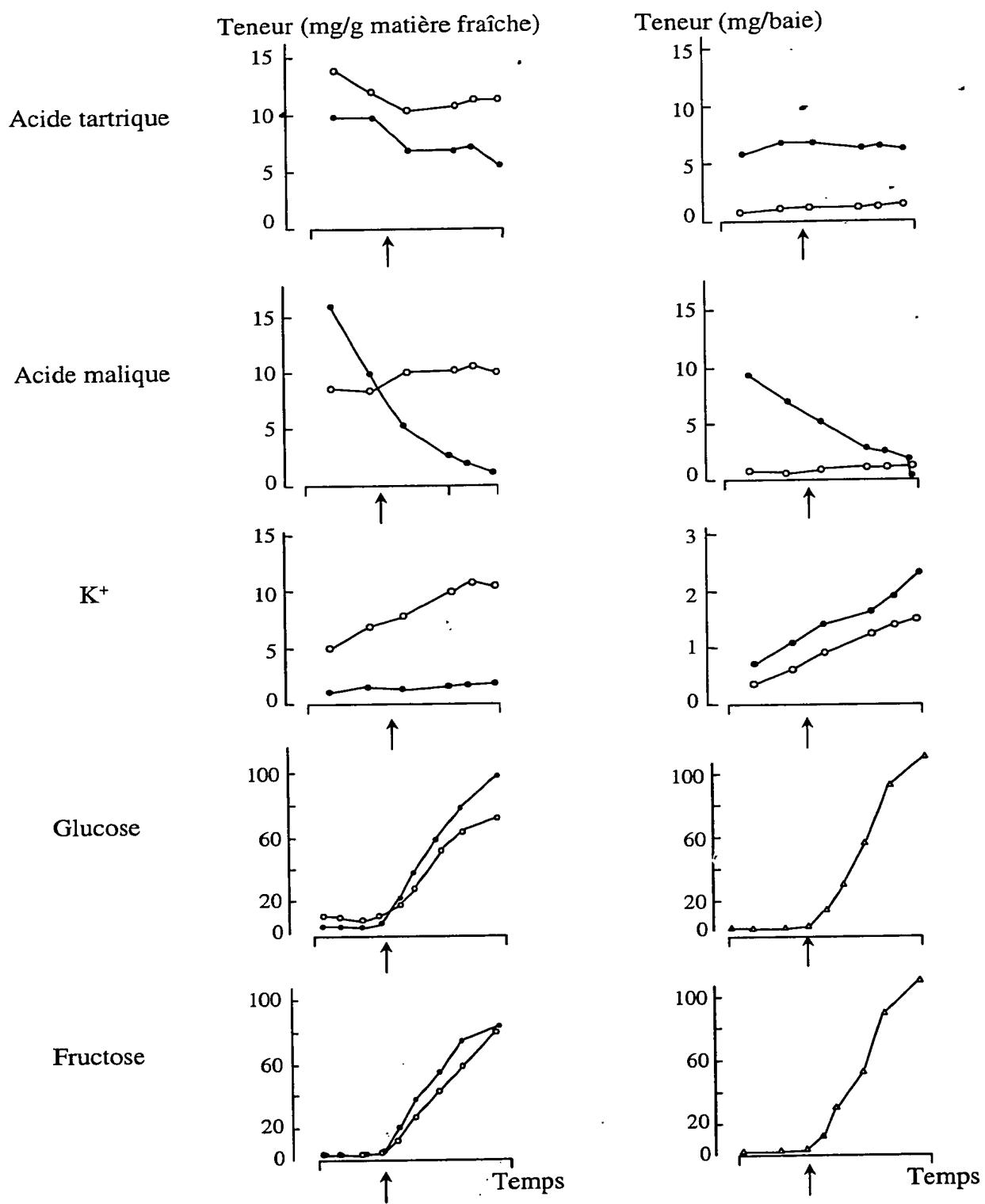


Figure 1.11 : récapitulatif de l'évolution des teneurs de la baie en acides tartrique et malique, en potassium, glucose et fructose au cours du développement de la baie (d'après Possner et Kliewer, 1985, et Iland et Coombe, 1988).

Les courbes représentent l'évolution de la quantité de chaque composé en mg par g de matière fraîche (1ère colonne) ou par mg par baie (2ème colonne). L'axe des abscisses représente le temps depuis le début du stade herbacé jusqu'à la maturité des baies (environ 150 jours). La flèche représente le moment de la véraison. Les cercles ouverts représentent l'évolution des composés dans l'exocarpe, les cercles noirs le mésocarpe, et les triangles la baie entière.

par la baie est dégradé par les enzymes de la glycolyse, puis transformé en acides organiques ou respiré.

A la véraison a lieu un brusque apport de sucres (figure 1.11). Le taux de sucres des baies verrées est multiplié par 6 à 7 pendant la première semaine suivant la véraison (Ollat, 1997). L'origine de cette accumulation soudaine reste peu expliquée, d'autant plus qu'elle peut se déclencher de façon très hétérogène au sein d'une même grappe. Ce stockage n'est pas attribuable aux capacités photosynthétiques du fruit, qui disparaissent à partir de la véraison. En revanche, la baie acquiert une capacité de puits puissant, capable d'induire l'augmentation de l'activité photosynthétique des feuilles (Candolfi-Vasconcelos et Koblet, 1991; Candolfi-Vasconcelos *et al.*, 1994b). Les sucres sont véhiculés depuis les organes sources (feuilles et ressources amylacées des tiges) par le phloème jusqu'à la baie. Le saccharose est le sucre majoritaire dans la sève phloémienne. Son hydrolyse très rapide dans la baie peut être considérée comme un moteur de l'accumulation des hexoses, car elle permet le maintien d'un gradient de concentration du saccharose entre les vaisseaux du phloème et la baie, favorisant la décharge du saccharose dans la baie. Des transporteurs d'hexoses et de saccharose ont été clonés récemment chez la vigne (Fillion *et al.*, 1997; A. Ageorges, communication personnelle), et leur expression est nettement augmentée à la véraison. Il a également été proposé pour justifier le brusque apport de sucres après la véraison, que la baie pourrait détourner vers elle les assimilats destinés initialement aux racines (Stoev et Ivanchev, 1977).

Pendant la phase de maturation, la concentration des hexoses augmente de façon linéaire, indépendamment du taux de croissance, ce qui se traduit par un enrichissement d'environ 10 g de glucides par jour et par grappe. Ainsi, la teneur en glucides passe de 1 % à environ 20 % pendant cette phase. La concentration en fructose est sensiblement équivalente à celle du glucose en fin de maturation (*Cf.* récapitulatif de la figure 1.11).

#### **1.12.4 Flux d'eau au cours de la maturation des baies**

La baie étant un fruit charnu, l'eau joue un rôle prépondérant dans son développement. La baie de raisin connaît deux périodes d'augmentation du volume cellulaire. Un grand nombre de composés organiques ou minéraux, en particulier les sucres qui constituent les osmoticum les plus importants de la baie, sont stockés sous forme soluble.

Les échanges d'eau peuvent se décomposer en apports par le système vasculaire et en pertes par transpiration. Ces deux aspects sont détaillés ci-dessous.

### ***Importation d'eau par le xylème et le phloème***

Les différents fruits n'importent pas tous leur eau selon les mêmes processus. Chez certains fruits comme la tomate, l'eau est principalement d'origine phloémienne. D'autres fruits sont alimentés en eau par les vaisseaux du xylème. Dans le cas de la pomme, l'eau arrive par le xylème ou par le phloème selon son stade de développement (Ho *et al.*, 1987; Lang, 1990). Chez la baie de raisin, l'eau est principalement d'origine xylémienne pendant le stade herbacé, puis majoritairement d'origine phloémienne après la véraison (Lang et Thorpe, 1989).

Avant la véraison, le flux d'eau xylémien représente environ 80 % des entrées d'eau dans la baie, soit environ 40 mm<sup>3</sup> par jour (Ollat, 1997). A partir de la véraison, le système vasculaire xylémien présente des ruptures, et la quantité d'eau amenée par ces vaisseaux se réduit. Pendant la maturation, le flux phloémien assure donc la totalité des importations d'eau, soit environ 50 mm<sup>3</sup> par jour (Ollat, 1997).

Ainsi, les deux afflux importants d'eau qui déterminent l'augmentation de la taille des cellules, pendant la phase herbacée et la phase de maturation, sont d'origine vasculaire différente. La phase de croissance ralentie reflétant le plateau herbacé correspond évidemment à un flux net bas, dû à un rapport importations/pertes d'eau proche de 1 (Ollat, 1997).

Le mode d'alimentation hydrique a des conséquences importantes sur la composition minérale des fruits, et sur les relations hydriques entre la partie végétative de la plante et les baies. Pendant le stade herbacé, la croissance des baies est très sensible au niveau d'alimentation hydrique (Matthews et Anderson, 1989). Il a été remarqué que le diamètre des baies évolue tout au long de la journée, avec des contractions correspondant à des périodes de déficit hydrique accentué de la plante (Greespan *et al.*, 1994). Un stress hydrique se traduit notamment par une forte amplitude des contractions journalières des baies. En revanche, pendant la maturation, le grossissement des baies est moins sensible au niveau d'alimentation, et l'amplitude des contractions journalières est moins grande (Greespan *et al.*, 1996). Enfin, on peut supposer que le changement du mode d'importation de l'eau au début de la maturation est en relation avec les processus qui contribuent à l'accumulation massive de sucres comme osmoticum à partir de ce stade.

D'un point de vue moléculaire, il a été montré chez la tomate que la protéine TRAMP, liée à la maturation et au stress hydrique (Fray *et al.*, 1994) présente de fortes identités de séquence avec des protéines de type PIP. Une aquaporine de vigne a été clonée (S. Pacaud, S. Delrot, non publié) et a été localisée sur la membrane plasmique. On peut imaginer qu'une régulation de l'activité des aquaporines, facilitant le franchissement par l'eau des barrières cytoplasmique et tonoplastique, jouerait un rôle dans les processus de maturation des fruits.

## 1.13 Le potassium chez la vigne

Le potassium a de multiples effets chez la vigne, non seulement au niveau des parties végétatives, mais aussi dans la baie, et par conséquent influe sur la qualité du vin. Ces différents aspects sont détaillés ci-dessous.

### 1.13.1 Le potassium dans les parties végétatives

La plupart des éléments minéraux ont été pris en compte chez la vigne dans le but d'optimiser les fertilisations. Comme nous l'avons vu dans la première partie, les rôles généraux du potassium se situent à trois niveaux :

- un rôle physico-chimique, avec la neutralisation des charges négatives des macromolécules (acides organiques, composés phosphorylés, protéines...), et la participation au potentiel osmotique cellulaire.
- un rôle enzymologique, puisque le potassium intervient en tant que cofacteur de réactions enzymatiques.
- un rôle dans les transports à travers les membranes et les transports à longue distance, par son intervention dans la régulation du potentiel électrique transmembranaire, les mouvements stomatiques, et la migration de métabolites de cellule à cellule ou par les systèmes vasculaires.

#### *Effets de la nutrition potassique chez la vigne*

Au niveau de la vigne, les apports de  $K^+$  se traduisent par une stimulation de la croissance, à condition que le niveau d'alimentation azotée soit suffisant. Dans le cas contraire, les effets des apports potassiques sont difficilement perceptibles. Le potassium va permettre un meilleur développement de la canopée, d'où une augmentation de la photosynthèse, et de la production de sucres. Il semble que l'apport de  $K^+$  favorise également l'initiation florale (le nombre d'inflorescences par bourgeon est plus important), ce qui représente pour Delmas (1971) une conséquence de l'effet de la fertilisation potassique sur la vigueur de la plante.

Le potassium intervient dans les flux d'eau. En tant qu'élément principal du potentiel osmotique vacuolaire, il joue un rôle dans la régulation du potentiel hydrique de la cellule et de la plante. D'autre part, en tant que cation mobile, il joue un rôle essentiel dans la régulation de l'ouverture stomatique, par ses entrées et sorties des cellules de garde (Cf. § 1.10). Il est toutefois intéressant de remarquer que dans les années sèches, où des carences potassiques sont souvent observées (difficultés pour la plante à s'alimenter en  $K^+$  dans les couches profondes pauvres en cet ion), il n'y a pas d'aggravation des symptômes de sécheresse par la carence potassique. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le potentiel hydrique

des feuilles et leur teneur en K<sup>+</sup>, sauf dans des cas de très faibles teneurs en K<sup>+</sup> (moins de 0,5 % de matière sèche). Dans ce cas, la chute du potentiel hydrique est liée au rôle osmotique de cet élément (Champagnol, 1984). Mis à part ces cas extrêmes, le maintien du potentiel hydrique est probablement rendu possible par des mécanismes compensateurs, tels que l'augmentation de la teneur en solutés organiques.

L'absorption de K<sup>+</sup> est plus ou moins efficace selon les conditions de culture et les capacités intrinsèques des divers porte-greffes et greffons. Ces capacités dépendent évidemment des caractéristiques cinétiques des systèmes de transport exprimés, mais aussi du profil et de la maille de colonisation racinaires, et de l'alimentation hydrique qui favorise la mobilité de K<sup>+</sup> du sol (Champagnol, 1984). Par exemple, le porte-greffe SO4 a un fort potentiel d'absorption, de même que les greffons de cv Carignan. A l'inverse, la Syrah présente des capacités d'absorption potassique beaucoup plus faibles.

### ***La carence potassique***

Les carences en potassium se traduisent par un épaississement des jeunes feuilles, puis des vieilles feuilles. La bordure des feuilles se décolore. Dans les cas graves, un phénomène de nécrose peut apparaître. Il semble que ces symptômes soient liés au rôle joué par K<sup>+</sup> dans les flux phloémiens (Champagnol, 1984; Cf. § 1.7.3). En outre, la carence en K<sup>+</sup> s'accompagne souvent d'une diminution de la teneur en sucres des baies, ainsi que d'une carence magnésienne (Morris, 1983). Enfin, un phénomène de brunissement peut se superposer à la carence potassique.

La carence potassique est favorisée par la sécheresse, qui limite les possibilités d'absorption de K<sup>+</sup> à partir des couches superficielles du sol. Elle est de plus aggravée par une fertilisation azotée trop importante, qui provoque une augmentation de la masse végétale et donc une plus grande dilution du potassium dans la plante, ainsi que par des récoltes excessives.

#### **1.13.2 Le potassium dans les baies**

La nutrition minérale de la plante influe sur la qualité du vin. L'effet précis de chacun des ions nutritifs est difficile à apprécier, à l'exception de celui du potassium, qui intervient dans l'équilibre acido-basique du moût. La répartition de cet ion dans la baie et ses effets ont donc été intensivement étudiés.

### ***Répartition du potassium dans les baies***

Le potassium est le cation majoritaire des baies, devant le calcium, le magnésium et le sodium. Sa répartition varie dans les différents tissus de la baie et au cours du développement. Le potassium est toujours plus concentré (environ 4 fois plus) dans le péricarpe que dans la pulpe (Possner et Kliewer, 1985; Storey, 1987). Sa teneur augmente tout au long du développement et de la maturation de la baie (Possner et Kliewer, 1985). La concentration de K<sup>+</sup> dans le péricarpe des baies matures est proche de 300 mmol.l<sup>-1</sup> (Storey, 1987) (figure 1.11). En outre, sa concentration peut atteindre 1 mol.l<sup>-1</sup> dans certaines cellules de la pulpe dans la périphérie proche des vaisseaux conducteurs et du pinceau (Storey, 1997; Iland et Coombe, 1988). Des analyses plus détaillées, en microscopie aux rayons X, ont montré que la répartition de K<sup>+</sup> dans l'hypoderme semble se faire selon un gradient diminuant des couches externes vers les couches internes. Il semble de plus y avoir une hétérogénéité de la distribution de K<sup>+</sup> dans les cellules de l'hypoderme en fonction de leur distance par rapport aux pôles de la baie (Storey, 1987). La transition avec les assises cellulaires de la pulpe est marquée par une nette discontinuité de la concentration de K<sup>+</sup>. L'accumulation de cet ion dans l'hypoderme résulte probablement du fait que cette couche cellulaire est très proche du système vasculaire périphérique, qui représente une large surface de décharge des solutés transportés par le phloème. L'hypoderme contient ainsi 33 % du K<sup>+</sup> du péricarpe, alors qu'il n'en constitue que les 10 %, chez le cv Tarrango (Storey, 1987).

### ***Origine du potassium des baies***

L'origine du potassium de la baie est encore mal connue. Les grappes contiennent plus de 50 % du potassium de la plante à maturité. Certains auteurs (pour revue, voir Champagnol, 1984) ont observé que les ions K<sup>+</sup> présents dans les baies semblent provenir des feuilles et des tiges par remobilisation et redistribution. Cependant, Levy *et al.* (1972) n'ont pu mettre en évidence un phénomène de remobilisation de K<sup>+</sup> dans les feuilles. K<sup>+</sup> étant un facteur essentiel de la régulation de la transpiration, et favorisant la photosynthèse, il semble peu probable que les feuilles soient à l'origine des ions K<sup>+</sup> des baies. Williams (1987) indique cependant que les ions K<sup>+</sup> des tiges semblent être en partie remobilisés, mais ne peut pas préciser si les ions concernés sont orientés vers les baies. Il suggère que les ions K<sup>+</sup> des baies proviennent plutôt des stocks des structures permanentes de la vigne et des prélèvements à partir de la solution du sol. Enfin, si le système vasculaire emprunté par K<sup>+</sup> pour arriver jusqu'aux baies reste indéterminé avant la véraison, le phloème est en revanche le chemin quasi-exclusif après la véraison, puisque le xylème présente alors des discontinuités entre les baies et le reste de la plante.

### ***Interactions du potassium avec les composants de la baie***

Le potassium de la baie est impliqué dans de nombreuses fonctions, dont celles qui ont été décrites auparavant au niveau de la plante entière. Il constitue l'osmoticum inorganique prépondérant dans les cellules de la baie, en particulier celles de la peau (Storey, 1987). Aussi, ses interactions avec les acides organiques de la baie ont été particulièrement étudiées. Il a ainsi été mis en évidence une corrélation entre les quantités de potassium et de malate après la véraison et le début de la phase de maturation (Hale, 1977), mais pas entre le potassium et le tartrate, quel que soit le stade de maturation. Le schéma des interactions K<sup>+</sup>/acides organiques s'est précisé depuis. Au stade vert, l'apport de K<sup>+</sup> intervient dans le grossissement cellulaire, du fait de son rôle d'osmoticum, et ce cation agit également en tant que contre-ion des acides tartrique et malique qui s'accumulent alors essentiellement dans le mésocarpe et un peu dans l'exocarpe (Possner et Kliewer, 1985; Coombe, 1987; Iland et Coombe, 1988). Puis, après la véraison, la perméabilité du tonoplaste à l'acide malique augmente (Gutiérrez-Granda et Morrison, 1992), et la fraction d'acide malique restée sous forme libre dans la vacuole passe dans le cytoplasme et y est respirée. Dans ces conditions, plus les quantités de K<sup>+</sup> sont importantes dans les baies (suite à une fertilisation potassique importante par exemple), plus la fraction de sels potassiques de malate est importante par rapport à la fraction d'acide malique libre, ce qui a fait dire à certains auteurs (*i.e.* Hale, 1977) que les quantités de malate augmentent quand la teneur en K<sup>+</sup> augmente. En réalité, l'acide malique sous forme de sels reste dans la vacuole et n'est pas respiré. La conséquence de cette accumulation de malate de potassium est une augmentation du pH du moût (Hale, 1977; Champagnol, 1984; Gutiérrez-Granda et Morrison, 1992), mais sans changement de l'acidité titrable (puisque ce paramètre est basé sur l'échange de protons).

Le tartrate est essentiellement sous forme de sels de K<sup>+</sup> (KHTartate) et Ca<sup>2+</sup>, qui sont très peu solubles. Pour Storey (1987), les sels de Ca<sup>2+</sup> sont majoritaires, bien que K<sup>+</sup> soit largement plus représenté que Ca<sup>2+</sup>, car le premier ion reste sous forme soluble dans la vacuole.

Ainsi, un excès de potassium dans les baies se traduit pour un moût insuffisamment acide, présentant un excès de malate, dont la fermentation va donner de l'acide lactique, rendant le vin instable d'un point de vue chimique et biologique. Comme nous l'avons déjà indiqué, si la fermentation malolactique est évitée, la présence de malate dans le jus est aussi facteur d'instabilité. De plus, les vins présentent une sensibilité accrue aux oxydations, un manque de saveur, et une couleur terne que l'on attribue à un degré d'ionisation des anthocyanes insuffisant (Morris, 1983; Champagnol, 1984).

L'alimentation potassique de la vigne se traduit donc par des effets variés au niveau des baies, et influence ainsi la qualité du vin issu de ces baies. Cependant, les détails de ces effets dans la baie doivent encore être déterminés. Les mécanismes responsables de l'apport de  $K^+$  dans les baies sont encore peu connus, et des précisions doivent être obtenues sur la localisation de  $K^+$  en fonction de ses modes d'import. Les recherches dans cette direction sont encouragées par une demande de la profession viti-vinicole, car le problème du manque d'acidité des vins peut de moins en moins être résolu par des interventions œnologiques, progressivement interdites par les législations. Un des objectifs à long terme de cette recherche serait de disposer de vignes dont l'apport de  $K^+$  dans les baies serait réduit, sans altération de la physiologie des feuilles et des mécanismes de régulation de la transpiration, aussi bien au niveau des parties végétatives que de la baie.

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à l'un des types de systèmes de transport potentiel de  $K^+$  : les canaux. Des banques d'ADN de vigne ont été ciblées, et les deux premiers canaux potassiques de vigne ont été clonés et caractérisés. Ces résultats sont détaillés dans les chapitres de cette thèse.

## Chapitre 2

### Matériel et Méthodes

#### **2.1 Matériel végétal**

##### **2.1.1 Culture de sarments de vigne sur perlite**

Les sarments de vigne (cv Pinot noir) sont prélevés sur des ceps au mois de décembre (lors de la taille d'hiver). Ils sont placés à 4°C dans une enceinte humide pendant deux semaines, puis ils sont mis à bouturer dans un bac contenant de la perlite humide, et leur extrémité supérieure est entourée de parafilm afin de limiter la transpiration. Lorsque les premières feuilles et les racines se sont développées, les boutures sont alimentées par du milieu de Hoagland dilué 4 fois (Hoagland et Arnon, 1950), renouvelé deux fois par semaine.

##### **2.1.2 Culture en hydroponie de boutures de vigne**

Les boutures sont transférées un support de polystyrène (30 cm x 30 cm x 3 cm) percé de trous (diamètre de 20 mm environ; une bouture par trou, et une dizaine de boutures réparties sur le support). L'ensemble est placé sur une bassine contenant 10 l de milieu de Hoagland dilué 4 fois, aéré par bullage continu, et renouvelé une fois par semaine.

##### **2.1.3 Culture d'entretien des cals embryogènes de vigne**

Les cals embryogènes sont cultivés en boîte de Petri, sur du milieu C<sub>1</sub>P (*Cf.* tableau 2.1), dans une enceinte à 28°C à l'obscurité. Ils sont repiqués tous les mois par scission à la lame de scalpel et dépôt des fragments sur du milieu neuf, afin d'éviter leur différenciation et l'amorce d'une embryogenèse.

##### **2.1.4 Culture d'*Arabidopsis***

###### ***Stérilisation des graines***

Les graines d'*Arabidopsis* sont immergées dans une solution contenant du bayrochlor (Bayrol) 4 % et de l'éthanol 50 %. La solution est agitée pendant 20 min, puis les graines sont rincées 3 fois avec de l'éthanol pur. L'éthanol résiduel est aspiré et les graines sont mises à sécher sous une hotte à flux laminaire. Elles sont semées sur un milieu gélosé.

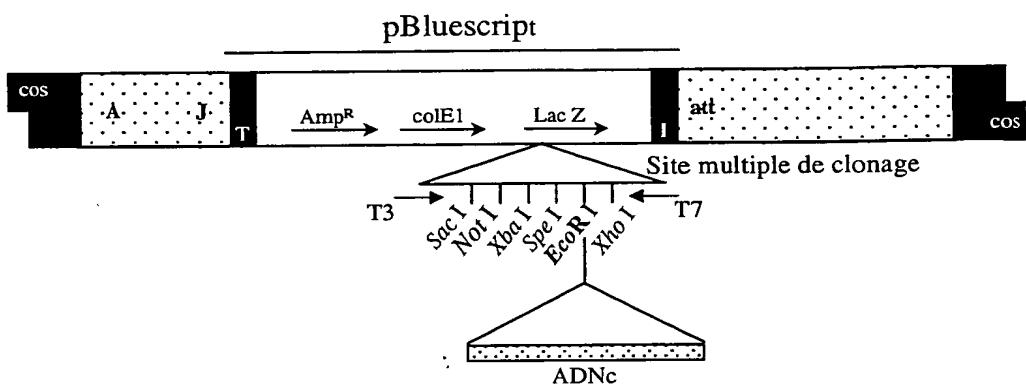


Figure 2.1 : représentation schématique du phage  $\lambda$  ZAP II.

Le phagemide pBluescript (3 kpb) est inséré dans le phage EMBL 3 (43 kpb; la représentation n'est pas à l'échelle). L'insert est cloné au site *EcoR* I de pBS. Cos: extrémités cohésives du phage permettant sa circularisation. A-J : gènes du phage nécessaires à l'assemblage des particules virales néo-formées. Att: site d'excision du prophage. T: domaine terminateur de réPLICATION du phage. I : domaine initiateur de réPLICATION du phage.

### **Culture en boîte de Petri**

Les graines axéniques sont semées sur milieu de Murashige et Skoog dilué deux fois (Murashige et Skoog, 1962; Sigma M5524) additionné de 1 % de saccharose, de 0,5 g.l<sup>-1</sup> de MES-KOH, pH 5,7, et de 7 g.l<sup>-1</sup> d'agar. Pour sélectionner les plantules transgéniques (paragraphe 2.6.4), le milieu est additionné d'hygromycine (30 mg.l<sup>-1</sup>, Sigma).

### **Culture en serre**

Les plantes sont cultivées en serre (23°C, luminosité supérieure à 300 μE.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, 16h/8h jour/nuit grâce à un appoint réalisé par des lampes à vapeur de sodium). Le substrat est constitué de terreau (Humin substrat N2 Neuhaus, Klasmann-Deilmann, Allemagne). L'arrosage est réalisé avec de l'eau par sub-irrigation une fois par semaine.

## **2.2 Criblage de banques d'ADN de vigne**

### **2.2.1 Matériel biologique**

Trois banques d'ADN de vigne ont été utilisées.

- Une banque d'ADNc de baies de raisin (cv Pinot noir), construite à partir d'ARN extraits de baies à différents stades de maturité (Clontech). Le vecteur de cette banque est le bactériophage λ ZAP II, qui contient le vecteur pBluescript (Stratagene) (figure 2.1). Les inserts sont clonés dans le multisite de clonage de pBluescript. La souche bactérienne utilisée comme hôte est la souche *E. coli* XL 1 blue.

- Deux banques d'ADN génomique, issues des cultivars Danuta et Pinot noir. La banque issue de Danuta est construite dans le vecteur λ GEM 12 (C. Tesnière, communication personnelle) (figure 2.2). La souche bactérienne hôte est la souche *E. coli* KW 251 (C. Tesnière, communication personnelle). La banque issue de Pinot noir est construite dans le bactériophage EMBL 3 SP6/T7 (A. Ageorges, communication personnelle). Deux souches bactériennes hôtes ont été utilisées : *E. coli* K802 et *E. coli* Pmc 128 (A. Ageorges, communication personnelle)

### **2.2.2 Préparation de bactéries compétentes pour l'infection de bactériophages**

Un volume V de LB (peptone 10 g.l<sup>-1</sup>, extrait de levure 5 g.l<sup>-1</sup> et NaCl 5 g.l<sup>-1</sup>) contenant du maltose 0,2 % et du MgSO<sub>4</sub> 10 mM estensemencé avec une colonie bactérienne. Après une nuit de culture, la suspension est centrifugée à 5000 g à 4°C pendant 10 min. Le culot

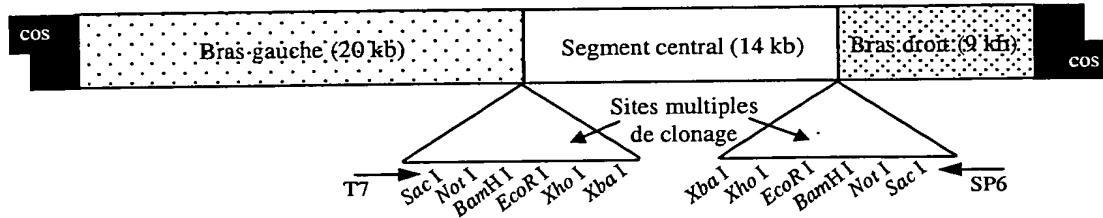


Figure 2.2 : représentation schématique du phage  $\lambda$  GEM 12.

Le site de clonage des inserts est le site *Xho* I partiellement comblé par un traitement par l'enzyme Klenow en présence de dCTP et dTTP, de manière à générer des extrémités cohésives avec les sites de restriction *Sau* 3AI partiellement comblés. L'ADN génomique a été digéré par l'enzyme *Sau* 3AI et traité par la Klenow en présence de dATP et dGTP. Cos : extrémités cohésives du phage permettant sa circularisation.

bactérien est resuspendu dans un volume V/2 d'une solution de  $MgSO_4$  10 mM froide. Les bactéries ainsi rendues compétentes sont maintenues sur la glace jusqu'à leur utilisation.

### 2.2.3 Etalement des bactériophages

Pour la banque d'ADNc, les bactériophages sont étalés à raison de 30000 à 40000 par boîte de Petri de 12x12 cm. Pour les banques d'ADN génomique, les bactériophages sont étalés à raison de 60000 phages par boîte de Petri.

Les dilutions adéquates de bactériophages sont mises en présence de 500 µl de bactéries compétentes. La suspension est incubée à 37°C pendant 15 à 30 min (15 min pour les banques d'ADNc, 30 min pour les banques génomiques). Sept ml de LB contenant 0,7 % d'agarose en surfusion (50°C) sont alors ajoutés, et la suspension est étalée sur une boîte de Petri contenant du LB et 15 g.l<sup>-1</sup> d'agar. Après une incubation à 37°C pendant 6 à 12 h, les boîtes sont placées à 4°C pendant au moins 2 h.

### 2.2.4 Répliques

Une membrane de Nylon (Biotrans™, ICN) est déposée sur la boîte et laissée 1 min en contact avec le milieu gélosé (respectivement 3, 9 et 15 min pour les deuxième, troisième et quatrième répliques). Les bactériophages présents au niveau des plages de lyse sont ainsi adsorbés sur la membrane. Les capsides des bactériophages sont dénaturées en plaçant la membrane pendant 7 min sur du papier Whatman 3MM imbibé de solution de dénaturation (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M). La membrane est ensuite immergée pendant 7 min dans une solution composée de NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M, pH 8, afin de neutraliser la solution de dénaturation. Elle est alors rincée dans du 2x SSC (SSC : NaCl 150 mM, citrate trisodique 15 mM, pH 7), puis placée dans un four à 80°C pendant 2 h, afin d'y fixer l'ADN.

### 2.2.5 Hybridation

Les sondes radioactives sont synthétisées comme décrit au § 2.3.4. La méthode d'hybridation utilisée dérive de celle de Church et Gilbert (1984). Deux membranes correspondant à une même boîte de Petri sont hybridées en parallèle, de manière à confirmer les signaux positifs. Les membranes sont préhybridées à 65°C pendant une heure dans un tampon composé de BSA 1 % (p/v), EDTA 1 mM, SDS 7 %,  $Na_2HPO_4$  0,5 M, pH 7. La sonde, dénaturée à 100°C durant 10 min, est alors rajoutée à raison de  $10^6$  cpm par ml de tampon d'hybridation. L'hybridation dure 2 j à 65°C. Les membranes sont lavées deux fois dans une solution de 2x SSC et de SDS 0,1 % pendant 10 min à température ambiante, puis dans une solution de 0,1x SSC et de SDS 0,1 % pendant 10 min à température ambiante; puis pendant 10 min à

65°C dans cette même solution (conditions déterminées après plusieurs essais et permettant le meilleur rapport signal/bruit de fond). Les deuxièmes répliques sont lavées de la même manière, mais dans une solution finale de 0,2x SSC et de SDS 0,1 %. Les membranes sont alors placées pour exposition sur film photographique RX (Fuji) à -80°C en présence d'écrans amplificateurs, pendant 5 à 7 j.

### **2.2.6 Carottage des plages positives**

Les signaux potentiellement intéressants sont repérés sur les autoradiogrammes et les phages des plages de lyse correspondantes sont prélevés par carottage de la gélose. Les carottes sont placées dans 1 ml de milieu SM (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, gélatine 0,01 %, pH 7,5) afin de permettre la diffusion des bactériophages qu'elles contiennent. De nouveaux étalements de ces bactériophages sont alors réalisés et soumis à de nouveaux criblages dans les mêmes conditions, jusqu'à obtention de bactériophages correspondant à un clone unique.

### **2.2.7 Obtention et analyse des inserts des bactériophages de la banque d'ADNc**

Deux cents µl de bactéries XL1 blue compétentes sont mélangés à 100 µl d'une suspension de bactériophages purs et à 1 µl de bactériophage "helper" R408 (10<sup>6</sup> plages de lyse, ou pfu, par ml, Clontech) et incubés à 37°C pendant 30 min. Cinq ml de LB sont alors ajoutés, et le mélange est placé en agitation à 37°C pendant 4 à 5 h. La suspension est alors placée à 68°C pendant 20 min, puis centrifugée à 5000 g, à 4°C pendant 5 min. Le surnageant contient le vecteur pBluescript et son insert sous forme de phagemides. Dix µl de phagemides sont alors mis au contact de 200 µl de bactéries compétentes et incubés à 37°C pendant 15 min. Une fraction aliquote de la suspension est étalée sur des boîtes contenant du milieu LB additionné d'ampicilline à 100 µg.ml<sup>-1</sup>. Après une nuit à 37°C, des colonies bactériennes contenant pBluescript et l'insert sont visibles. Cet insert est récupéré par extraction du plasmide et digestion enzymatique.

### **2.2.8 Production d'ADN des phages des banques génomiques**

Les phages λ GEM 12 et EMBL 3 ne permettent pas de récupérer directement l'insert. Il faut donc préparer de l'ADN total du bactériophage, puis libérer l'insert par digestion enzymatique. Des plages de lyses correspondant à un phage unique sont obtenues comme expliqué ci-dessus. Trois ml de tampon "λ diluent" (Tris-HCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,5) sont déposés à la surface du milieu gélosé, et les boîtes de Petri sont soumises à une agitation douce pendant 2 h, afin de mettre en suspension les phages dans le tampon. Cette suspension

est centrifugée à 4000 g à 4°C pendant 15 min. Le surnageant est incubé à 37°C pendant 15 min en présence de 1 µg de RNase et de DNase. Un volume égal d'une solution de PEG 8000 20 %, NaCl 2 M, est alors ajouté, et le mélange est placé pendant 1 h à 0°C. Les particules phagiques en suspension sont alors récupérées par une centrifugation à 10000 g à 4°C pendant 20 min. Le culot est remis en suspension dans 500 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). La suspension est placée à 68°C pendant 5 min en présence de 5 µl de SDS 20 %. Après ajout de 10 µl de NaCl 5 M, les protéines phagiques sont extraites par un volume égal d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (50/48/2 v/v/v, mélange PCI), puis de chloroforme/alcool isoamylique (48/2 v/v, mélange CI). L'ADN phagique est alors précipité par l'addition d'un volume égal d'isopropanol, et centrifugé à 12000 g, à 4°C pendant 30 min. Le culot est lavé par de l'éthanol 70 %, séché, et repris dans 200 µl d'eau. Les acides nucléiques sont alors incubés à 37°C pendant 1 h en présence de 40 µg de RNase. Après extraction des protéines par un traitement par du PCI, puis du CI, l'ADN est précipité par ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 4,8 et 2 volumes d'éthanol absolu. Après centrifugation, l'ADN est resuspendu dans 200 µl de TE.

L'ADN est ensuite soumis à 6 digestions enzymatiques différentes et déposé sur gel d'électrophorèse. Ce dernier est ensuite transféré sur membrane de Nylon (*Cf. § 2.3.3*), afin de procéder à une cartographie de l'insert par la méthode de Southern. Les fragments d'intérêt sont alors purifiés, clonés et séquencés.

## 2.3 Purification et analyse des acides nucléiques

### 2.3.1 Purification des ARN totaux

L'eau, les solutions d'acétate de sodium et de LiCl sont traitées au diéthylpyrocarbonate (DEPC) avant d'être autoclavées.

L'obtention d'ARN de qualité avec un bon rendement à partir de tissus de vigne est problématique, peut-être du fait de la richesse en polyphénols et polysaccharides de ces tissus. Différents protocoles ont donc été développés.

#### *Extraction d'ARN de cellules de baies en culture*

Le protocole utilisé est décrit par Lobréaux *et al.* (1993). Les cellules de baies (5 g) sont broyées dans de l'azote liquide à l'aide d'un pilon et d'un mortier. Le broyat est mélangé à 5 ml de tampon d'extraction (guanidine-HCl 8 M, β-mercaptopéthanol 50 mM, MES 20 mM, EDTA 20 mM, pH 7). L'ensemble est agité pendant 10 min, puis les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation à 10000 g pendant 15 min. Le surnageant est additionné d'un

volume de PCI, agité pendant 5 min, puis centrifugé à 10000 g pendant 20 min. Les acides nucléiques, contenus dans la phase aqueuse, sont précipités en présence de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 4,8 et de 1 volume d'isopropanol, à -20°C. Le culot d'acides nucléiques obtenu après centrifugation à 10000 g pendant 30 min est repris dans 3 ml d'eau. Les ARN sont précipités par addition de 750 µl de LiCl 10 mM à 0°C pendant 16 h. Après une centrifugation à 10000 g pendant 30 min, le culot contenant les ARN est lavé avec de l'éthanol 70 %, transféré dans un microtube de 1,5 ml et solubilisé dans 200 µl d'eau. La solution est traitée par 200 µl de CI afin d'éliminer les polysaccharides résiduels. La concentration des ARN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm.

#### *Extraction d'ARN des parties végétatives aériennes*

Le protocole utilisé dérive de celui décrit par Fillion *et al.* (1999). Le matériel végétal (1,5 g) est broyé dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon, puis est mélangé à 10 ml de tampon d'extraction (perchlorate de sodium 5 M, Tris-HCl 0,3 M pH 8,3, PVPP 8,5 %, PEG 4000 2 %, SDS 1 %, β-mercaptoproéthanol 1 %). La solution est incubée à 37°C pendant 30 min, puis centrifugée à 5500 g à 4°C pendant 15 min. Le surnageant est filtré sur 2 couches de Miracloth (Calbiochem) et additionné de 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Après centrifugation à 5500 g à 4°C pendant 15 min, le culot d'acides nucléiques est lavé par de l'éthanol 70 %, séché, puis solubilisé dans 4 ml d'eau. Les protéines sont extraites par trois additions de 4 ml de PCI, puis deux de 4 ml de CI. L'ajout de 0,5 volume d'éthanol absolu permet de précipiter une partie des polysaccharides restants. Après centrifugation à 9000 g, à 4°C pendant 10 min, le surnageant contenant les ARN est additionné de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et de 2,5 volumes d'éthanol absolu. Après précipitation, le culot d'ARN est lavé par de l'éthanol 70 % et repris dans 100 µl d'eau.

Si la solution est très visqueuse, une seconde extraction de polysaccharides est réalisée par addition de 0,5 volume d'éthanol absolu, et les ARN sont précipités de la même manière que précédemment. Ils sont solubilisés dans 100 µl d'eau. La concentration des ARN est estimée par mesure de l'absorbance à 260 nm.

#### *Extraction d'ARN de baies*

Le protocole d'extraction des ARN totaux de baies de raisin dérive de celui décrit par Tesnière et Vayda (1991). Cinq g de baies épépinées et broyées dans de l'azote liquide sont mélangées à 23 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl 200 mM, LiCl 300 mM, EDTA 10 mM, déoxycholate de sodium 1 %, SDS 1,5 %, anthranilamide 1 mM, thio-urée 5 mM, DTT 10 mM, Igépal 1 %, pH 8,5). Après centrifugation à 12000 g à 4°C pendant 30 min, le surnageant est filtré sur du Miracloth. Après ajout de CsCl (0,2 g.ml<sup>-1</sup>), le mélange est déposé

sur un coussin de 10 ml composé de CsCl 5,7 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, et soumis à une ultracentrifugation à 25000 rpm (Beckman, SW 28) à 20°C pendant 24 h. Le culot d'ARN est solubilisé dans 1 ml d'eau. Après une nouvelle précipitation obtenue par addition de 0,2 volume de LiCl 3 M et 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 1 h, puis centrifugation à 12000 g à 4°C pendant 30 min, le culot est lavé trois fois par 500 µl d'acétate de sodium 3 M, pH 5,5, et centrifugé à 12000 g à 4°C pendant 15 min. Le culot est ensuite lavé par 500 µl d'éthanol 70 %, puis séché. Les ARN sont remis en suspension dans 50 µl d'eau, et leur concentration estimée par mesure de l'absorbance à 260 nm.

### ***Extraction d'ARN de racines***

Ce protocole est décrit par Parcy (Parcy *et al.*, 1994; Parcy et Giraudat, 1997). Un g de broyat de racines est mélangé à 2 ml de tampon d'extraction composé de Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 25 mM, NaCl 75 mM, SDS 1 %, β-mercaptoproéthanol 1 M. Deux ml de mélange PCI (50/24/1 v/v/v) sont rajoutés. Les échantillons sont alors gardés dans la glace durant toute la purification. Après centrifugation à 10000 g à 4°C pendant 10 min, la phase aqueuse est traitée une seconde fois par 2 ml de PCI 50/24/1. Après centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment, la phase aqueuse est traitée par 2 ml de CI. Les ARN sont alors précipités par ajout goutte à goutte d'un quart de volume de LiCl 10 M. Le mélange est placé à 0°C durant une nuit. Après centrifugation à 10000 g à 4°C pendant 20 min, le culot est cassé dans du LiCl 2 M, puis centrifugé à 12000 g à 4°C pendant 5 min. Il est alors resuspendu dans 400 µl d'eau, et reprécipité par ajout d'un dixième de volume d'acétate de sodium 3 M et de 2 volumes d'éthanol absolu. Après centrifugation à 10000 g à 4°C pendant 20 min, et lavage à l'éthanol 70 %, le culot est resuspendu dans 200 µl d'eau. La concentration des ARN est estimée par mesure de l'absorbance à 260 nm.

### **2.3.2 Purification d'ADN génomique de vigne**

Le matériel végétal (3 g d'organes en développement) est broyé dans de l'azote liquide et mélangé à 20 ml de tampon d'extraction (CTAB 2 %, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, β-mercaptoproéthanol 0,5 %, pH 8). Le mélange est placé à 65°C pendant 1 h et est agité périodiquement. Après une addition d'un volume de CI, la solution est agitée doucement pendant 20 min, puis centrifugée à 5000 g à 4°C pendant 20 min. Le surnageant est additionné de 4 ml de CTAB 10 % et agité doucement jusqu'à obtention d'un mélange huileux. Un volume de CI est alors ajouté, et l'ensemble est agité doucement pendant 30 min. Après centrifugation à 5000 g à 4°C pendant 20 min, les acides nucléiques contenus dans la phase aqueuse sont précipités par addition lente de 10 ml d'isopropanol froid, puis centrifugation à 5000 g à 4°C pendant 5 min. Le culot est lavé avec de l'éthanol 70 %, séché,

et resuspendu dans 500 µl de TE. Cinquante µg de RNase sont ajoutés, et la solution incubée à 37°C pendant 1 h. Quatre cents µg de protéinase K sont alors rajoutés, et la solution est incubée à 50°C pendant 30 min. Les protéines sont extraites par 3 traitements successifs avec 500 µl de PCI. La phase aqueuse est ensuite traitée par du CI (2 extractions en général). L'ADN est alors précipité par ajout de 0,6 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M et de 2 volumes d'éthanol absolu. Après centrifugation à 12000 g à 4°C pendant 30 min, le culot est lavé par de l'éthanol 70 %, séché, et dissous dans 200 µl de TE. La concentration de l'ADN est estimée, après électrophorèse en gel d'agarose, par comparaison de l'intensité d'une fraction aliquote de la solution d'ADN génomique avec l'intensité de la bande à 23 kpb de l'ADN du bactériophage λ digéré par *Hind* III (Eurobio).

### **2.3.3 Fractionnement des acides nucléiques sur gel d'agarose et transfert sur membrane de Nylon**

Les ARN sont fractionnés par électrophorèse en gel d'agarose (1,2 %), dans un tampon composé de MOPS 20 mM, d'acétate de sodium 1 mM, d'EDTA 1 mM et de formaldéhyde 6,6 %, pH 7. Avant électrophorèse, les échantillons sont dénaturés dans du tampon de migration, en présence de formamide 45 %, de formaldéhyde 6,6 % et de bromure d'éthidium (BEt) 0,02 mg.ml<sup>-1</sup>, à 65°C pendant 10 min. La migration est réalisée à 40 V pendant 3,5 h, dans une cuve "Wide mini-sub Cell" (BioRad). Après migration, les ARN peuvent être transférés sur une membrane de Nylon (GeneScreen, NEN) par capillarité dans du tampon 10x SSC durant une nuit. La membrane est rincée dans du 2x SSC, puis est soumise à une irradiation aux UV (254 nm, Fluo-link, Bioblock) pendant 1-2 min de façon à y fixer les ARN. La membrane peut être stockée sèche à 4°C.

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose (concentration variable, de 0,7 à 2 %) dans un tampon TAE (Tris-acétate 40 mM pH 8,5, EDTA 1 mM) en présence de BEt 0,02 %. Après migration, les fragments peuvent être transférés sur une membrane de Nylon. Pour cela, l'ADN est partiellement "dépuriné" par immersion du gel dans de l'HCl 0,25 N pendant 30 min. Le gel est ensuite agité dans un tampon de dénaturation (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) pendant 30 min. Après deux rinçages avec de l'eau, il est placé dans un tampon de neutralisation (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 7,2, EDTA 1 mM) pendant 30 min. L'ADN est transféré sur une membrane de Nylon (Biotrans™, ICN) par capillarité dans du tampon 10x SSC, comme décrit ci-dessus pour les ARN.

### **2.3.4 Hybridation moléculaire**

#### ***Marquage des sondes radioactives en "random priming"***

Les sondes sont marquées avec du  $^{32}\text{P}$  en utilisant le kit Prime-a-Gene<sup>TM</sup> (Labelling System, Promega), selon les indications du fournisseur. Pour cela, 50 ng de matrice ADN double brin dénaturés à la chaleur sont mis en présence d'hexanucléotides de séquence aléatoire, d' $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP et d' $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP 333 nM (activité spécifique : 3000 Ci.mmol<sup>-1</sup>), de dTTP et de dGTP 20  $\mu\text{M}$ , de BSA 400 ng. $\mu\text{l}^{-1}$  et du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* dans le tampon de réaction (Tris-HCl 50 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 2 mM, HEPES 200 mM pH 6,6). Après 1 h à température ambiante, les molécules marquées sont séparées des oligonucléotides et des nucléotides non incorporés par passage sur une colonne d'exclusion (Sephadex G50, Nick Column, Pharmacia).

#### ***Marquage des sondes par PCR***

Cette technique est utilisée pour marquer des fragments d'ADN de taille inférieure à 300 pb. Entre 10 et 20 ng du fragment à marquer sont mélangés au tampon de réaction (25  $\mu\text{l}$ ) additionné de MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, de 2,5 pmoles de chaque amorce, de  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP 333 nM, de dCTP, dTTP et dGTP 30  $\mu\text{M}$ , de dATP 666 nM et de 0,25 unité d'*ExtraPol I* (Eurobio). Le protocole d'amplification est le même que celui décrit au paragraphe 2.4, excepté pour le temps de polymérisation, qui est de 2 min.

#### ***Hybridation des acides nucléiques***

Les membranes obtenues après transfert des ADN ou des ARN sont d'abord mouillées avec du 5x SSC. Elles sont ensuite mises en présence de tampon d'hybridation (formamide 50 %, 5x SSC, sulfate de dextran 10%, N-lauryl-sarcausine 1 %) à 44°C. La sonde marquée avec du  $^{32}\text{P}$  ( $3.10^6$  cpm par ml de tampon d'hybridation) et de l'ADN de sperme de saumon soniqué (Eurobio, 100  $\mu\text{g}$  par ml de tampon d'hybridation) sont dénaturés à 95°C pendant 10 min et mis en présence de la membrane. Après une nuit à 44°C, la membrane est lavée deux fois dans une solution de 2x SSC, SDS 0,1 % à température ambiante pendant 10 min, puis dans une solution de 0,1x SSC, SDS 0,1 % à 44°C pendant 30 min. La membrane est appliquée contre un écran de phosphore. Les signaux sont détectés sur cet écran à l'aide d'un Phosphorimager (Storm 860) et quantifiés à l'aide du logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Les membranes sont ensuite mises en autoradiographie, contre un film RX (Fuji), en présence d'un écran intensificateur.

## 2.4 Amplification des acides nucléiques par PCR

### 2.4.1 PCR

Les réactions de PCR sont réalisées à l'aide de la polymérase thermostable de *Thermus brokianus* (*ExtraPol I*, Eurobio). Le mélange réactionnel (50 µl) contient du tampon de réaction fourni avec l'enzyme (Tris-HCl 10 mM pH 8,8, KCl 50 mM, Triton X100 0,1 %), MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 0,5 unité d'*ExtraPol I*, chacun des déoxynucléotides triphosphate (dNTP) 200 µM, 5 pmoles de chaque amorce nucléotidique, et de 0,1 à 50 ng de matrice. Généralement, les protocoles d'amplification comportent un traitement de 5 min à 95°C, suivi de 35 à 40 cycles dénaturation / hybridation / élongation : 45 s à 95°C / 30 s à la température d'hybridation des amorces / 1 à 3 min à 72°C. La température d'hybridation est de 2 degrés inférieure à la Tm des amorces, calculée selon la formule  $Tm=2x(A+T)+4x(G+C)$ . Le temps de réaction varie en fonction de la longueur du fragment à amplifier : généralement une minute par kpb à amplifier.

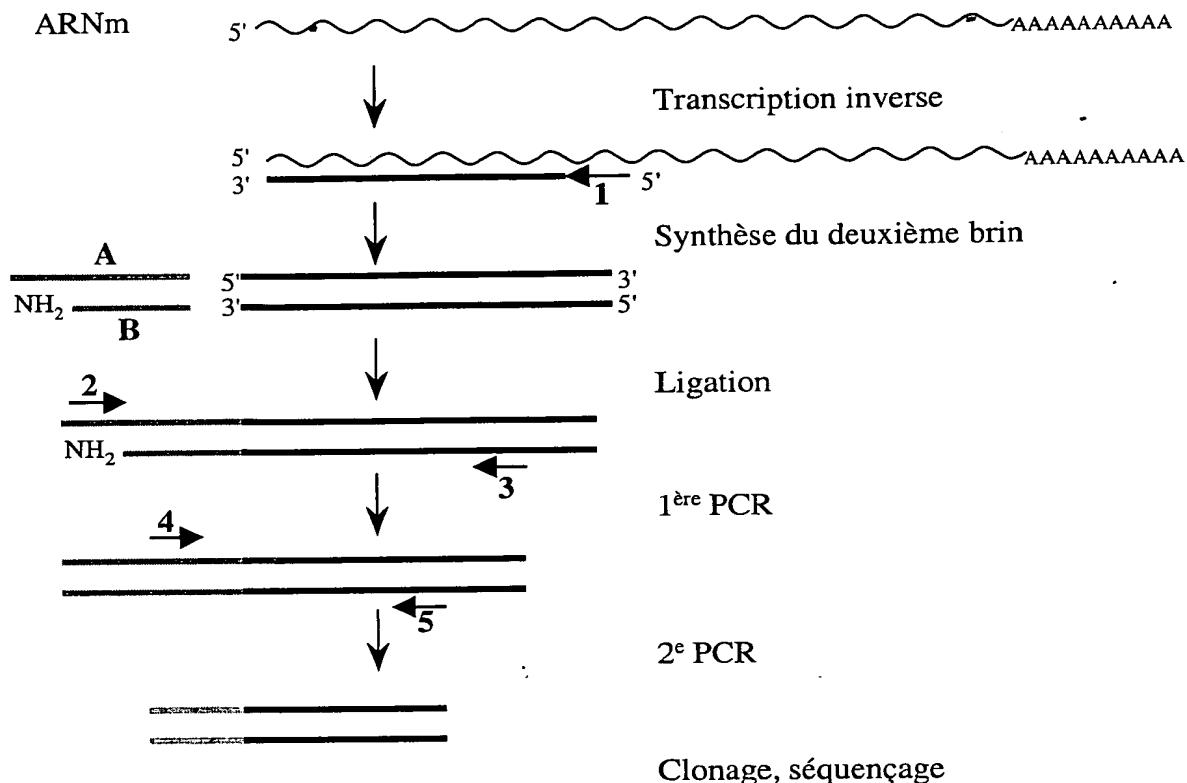
Lors des amplifications de séquences promotrices et d'ADNc, la polymérase thermostable de *Pyrococcus furiosis* (*Pfu*, Promega) est utilisée. Elle possède une activité exonucléase de 3' vers 5' et permet une amplification de l'ADN avec un taux d'erreur très faible. Avec cette enzyme, les réactions de PCR sont réalisées dans du tampon (Tris-HCl 20 mM pH 8,8, KCl 10 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, Triton X100 0,1 %, BSA 0,1 mg.ml<sup>-1</sup>) additionné des mêmes composants que le tampon utilisé pour l'enzyme *ExtraPol I*. Le temps de polymérisation est de 2 min/kpb.

### 2.4.2 5'-RACE

Cette technique permet d'amplifier par PCR la partie 5' inconnue d'un ADNc à partir d'une préparation d'ARNm. Le protocole est présenté sur la figure 2.3.

Les ARN totaux sont extraits par les méthodes décrites dans le § 2.3.1. Les ARNm sont purifiés en utilisant le système polyAtract™ (Promega) selon les recommandations du fournisseur. La transcription inverse de 2 µg d'ARNm est réalisée en présence de 10 pmoles de l'oligonucléotide 1 (figure 2.1) et de 200 U de Superscript™ (Gibco-BRL) selon les recommandations du fournisseur. Le deuxième brin d'ADN est synthétisé dans 100 µl d'un milieu (Tris-HCl 40 mM pH 7,2, KCl 90 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 3 mM, BSA 0,5 µg.ml<sup>-1</sup>, dNTP 0,2 mM) contenant 23 U d'ADN polymérase I d'*E. coli* (Promega) et 0,8 unité de RNase H (Promega) à 14°C pendant 2 heures. Une unité d'ADN polymérase du phage T4 est ajoutée au mélange. Après 10 min d'incubation à 37°C, 10 µl d'EDTA 200 mM et un volume de PCI (50/48/2) sont ajoutés successivement. La phase aqueuse est traitée avec un volume de CI (48/2), et les acides nucléiques sont précipités par l'addition de 0,5 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M, de 0,4 µl de glycogène 35 mg.ml<sup>-1</sup> et de 2,5 volumes d'éthanol. Après

A



B

Adaptateurs et amorces

- A 5' CTAATACGACTCACTATAAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGGAGGT 3'  
B 5' P-ACCTCCC-NH2 3'  
2 5' GGATCCTAATACGACTCACTATAAGGC 3'  
4 5' CTATAGGGCTCGAGCGGC 3'

Amorces spécifiques de SOR

- 1 5' GCACACCCTAACCTAACCTAACATAAG 3'  
3 5' CCCTGTAGGCAAGGAAGAACGGAGC 3'  
5 5' GGGTGTAAAAATGAAGAGTACACTG 3'

Figure 2.3 : principe de la 5'-RACE et séquences des oligonucléotides utilisés pour l'amplification des parties 5' de l'ARNm SOR.

Le protocole est décrit dans le paragraphe 2.4.2. A. Un ADN simple brin est synthétisé par transcription inverse des ARNm à l'aide de l'amorce 1 s'appariant au niveau de la partie codant le segment S4 de SOR. Le deuxième brin est synthétisé et l'ADN double brin obtenu (en noir) est ligaturé à un fragment d'ADN double brin (adaptateur) possédant une extrémité 5' sortante aminée (fragments A et B, en gris). La première réaction de PCR est réalisée avec l'amorce 2 s'hybridant au niveau du fragment d'ADN ligaturé et l'amorce 3 s'hybridant au niveau de la partie codant le segment S2 de SOR. La deuxième réaction de PCR est réalisée avec une autre amorce (4) s'hybridant au niveau du fragment d'ADN ligaturé et l'amorce 5 s'hybridant au niveau de la partie codant le segment S1 de SOR. Les fragments d'ADN obtenus sont clonés et séquencés. B. Séquences de 5' vers 3' des amorces utilisées.

15 min à -20°C, la solution est centrifugée et le culot d'ADNc est remis en suspension dans 10 µl d'eau.

Deux oligonucléotides (A et B sur la figure 2.3), sont mélangés en rapport équimolaire (10 µM final) à 95°C et sont hybridés par diminution progressive de la température jusqu'à 25°C. Deux µl de la solution contenant l'oligonucléotide double brin ainsi formé (adaptateur) sont mélangés à 5 µl de la solution contenant l'ADNc, en présence de tampon et de 1 unité de ligase (GIBCO-BRL). La réaction de ligature se déroule à 16°C pendant une nuit. Le produit de ligature est dilué 10 fois avant les réactions de PCR.

Une première réaction de PCR (30 cycles) est réalisée avec des amorces s'hybridant dans l'adaptateur d'une part et en amont de l'amorce de transcription inverse d'autre part (oligonucléotides 2 et 3, figure 2.3). Les températures d'hybridation des 10 premiers cycles varient de 70 à 60°C afin de favoriser lors de l'amplification les hybridations les plus spécifiques. Une deuxième PCR (35 cycles) est réalisée en prenant une dilution du produit de la première PCR comme matrice, et en utilisant une amorce s'hybridant dans l'adaptateur et une s'hybridant dans l'ADNc (oligonucléotides 4 et 5, figure 2.3). Le produit de cette deuxième PCR est déposé sur gel d'agarose 2 %. Les fragments peuvent ensuite être clonés et séquencés.

#### 2.4.3 RT-PCR

Dix µg d'ARN totaux, ou 500 ng d'ARNm (purifiés comme décrit dans le § précédent) sont incubés à 65°C pendant 5 min en présence de 5 pmoles d'oligonucléotide (polyd(T)<sub>15</sub> ou amorce spécifique), dans un volume de 10 µl. Le mélange est alors placé à 42°C, et le milieu réactionnel contenant 200 U de l'enzyme *Superscript II* (Gibco-BRL) est rajouté, selon les indications du fournisseur. La réaction dure 30 min. Un µl du mélange peut alors servir de matrice pour une réaction de PCR, comme décrit dans le § 2.4.1.

#### 2.4.4 RT-PCR quantitative

La méthode est identique à celle des RT-PCR classiques décrite ci-dessus, mais il faut se placer dans des conditions qui permettent de comparer les quantités de produits d'amplification, et répéter le processus de manière à obtenir un résultat statistiquement significatif.

Trois réactions de transcription inverse indépendantes sont réalisées, chacune avec 5 pmoles d'amorce spécifique de chaque gène testé et d'un gène témoin dont l'expression est considérée comme constitutive. Les produits de ces réactions sont ensuite mélangés, de

manière à niveler les différences d'efficacité de réaction. Un  $\mu$ l de ce mélange sert de matrice pour les réactions de PCR. Pour chaque gène étudié, 3 PCR indépendantes sont effectuées.

Au cours des réactions de PCR, entre le dixième et le vingt-quatrième cycle, des aliquotes de 2,5  $\mu$ l sont prélevées. Elles sont déposées dans des tubes au fond desquels 0,8  $\mu$ mol de NaOH a été asséché, de manière à dénaturer les produits de PCR sans augmentation de volume, car cela peut introduire un biais dans les petits volumes pipetés par la suite. Un  $\mu$ l des produits de PCR ainsi dénaturés est alors déposé sur une membrane sous forme de "dots". La membrane est hybridée avec une sonde correspondant à l'ADNc étudié, selon le protocole décrit au paragraphe 2.3.4. Les signaux sont détectés sur un écran par un Phosphorimager (Storm 860) et quantifiés à l'aide du logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Dans un premier temps, l'analyse statistique qui suit à pour but de déterminer à quels cycles l'amplification PCR se fait de manière linéaire, et dans un deuxième temps, de quantifier la quantité de transcrits par rapport au gène témoin à un cycle donné.

## 2.5 Autres techniques de biologie moléculaire

### 2.5.1 Clonage

Les protocoles des techniques de base de biologie moléculaire (purification d'ADN plasmidique, clonage, transformation d'*E. coli*) sont ceux décrits dans le manuel Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 1993). Sauf indication contraire, les enzymes de restriction et de modification de l'ADN proviennent de Gibco BRL et sont utilisées selon les recommandations du fournisseur. Les souches bactériennes utilisées pour les amplifications de clones sont *E. coli* DH5 $\alpha$  et *E. coli* JM109. Le séquençage de l'ADN est réalisé par la technique de terminaison de chaîne (Sanger, 1977) à l'aide du kit T7 Sequencing (Pharmacia) suivant les recommandations du fournisseur.

### 2.5.2 Mutagénèse

La mutagénèse de l'ADNc *SOR* a été réalisée à l'aide du kit "Site-directed mutagenesis with the Altered Sites II System", selon les instructions du fournisseur (Promega). Le principe de la mutagénèse est basé sur l'amplification d'un fragment d'ADN simple brin à l'aide d'un oligonucléotide contenant les mutations à insérer et de la polymérase du phage T4, puis sa multiplication clonale dans des bactéries dépourvues de l'activité de réparation des mésappariements (ES1301).

La première étape consiste à cloner dans le vecteur pAlter du kit une "cassette" correspondant à un fragment de l'ADNc qui comporte la séquence à muter. L'ADNc *SOR* est

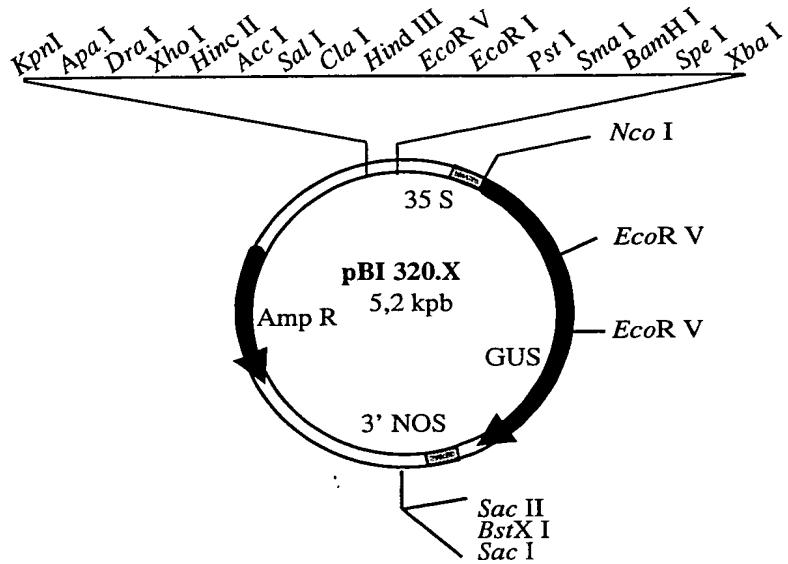


Figure 2.4 : carte du plasmide pBI 320.X.

Il contient à la suite du site multiple de clonage une construction composée du gène rapporteur GUS, placé sous le contrôle du promoteur 35S, et suivi du terminateur de la nopaline synthase (3'NOS). Le site *Nco* I est situé au niveau du codon initiateur de la traduction du gène GUS. Ce plasmide porte le gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection bactérienne.

donc digéré au niveau des sites uniques de restriction *Nsi* I (position 58) et *Ssp* I (position 1711), et le fragment de 1650 pb est cloné dans pAlter au niveau des sites *Pst* I et *Sma* I du polylinker. Le plasmide dénaturé par NaOH 0,2 N est mis en présence d'une amorce fournie dans le kit (0,25 pmoles) et de l'oligonucléotide comportant la séquence mutée :

5' CATTCTCTCAGATTACAGCATGTAGATCTCCTCTACGAACAGTGGCCATTGT  
GATGATTGC 3' (0,25 pmoles). La séquence de cet oligonucléotide a été déterminée de manière à introduire un site de restriction *Bgl* II, qui n'existe pas dans le vecteur pAlter ni dans la séquence de l'ADNc sauvage, ce qui permet un criblage rapide. Le mélange est incubé en présence de 10 U de polymérase du phage T4 et de 3 U de ligase de manière à circulariser les fragments amplifiés. Des bactéries ES1301 compétentes (100 µl) sont transformées par 1,5 µl du mélange réactionnel précédent. Une minipréparation d'ADN permet de récupérer les plasmides possédant un site de restriction *Bgl* II. Ces plasmides sont retransformés dans des bactéries JM109 de manière à les amplifier et les séquencer.

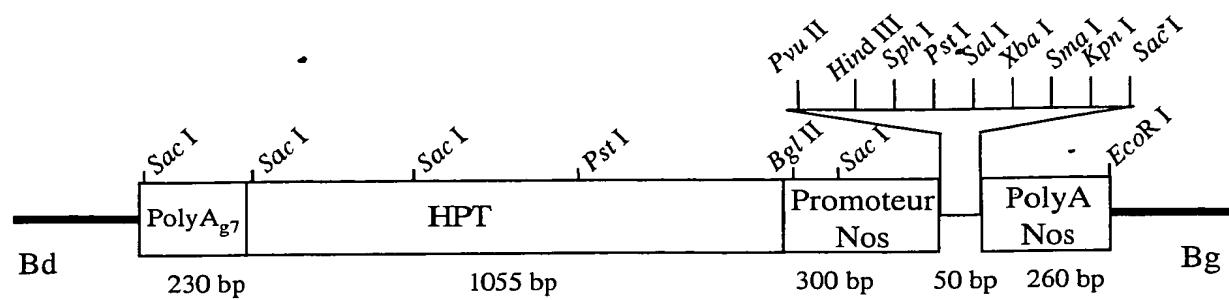
Après maxipréparation d'un plasmide comportant effectivement les mutations désirées, la cassette est excisée du vecteur pAlter au niveau des sites uniques *Pflm* I (position 495) et *BseR* I (position 1147), et insérée dans l'ADNc *SOR* digéré par les mêmes enzymes. L'ensemble est séquéncé avant l'utilisation pour la transformation de plantes.

## 2.6 Transformation génétique

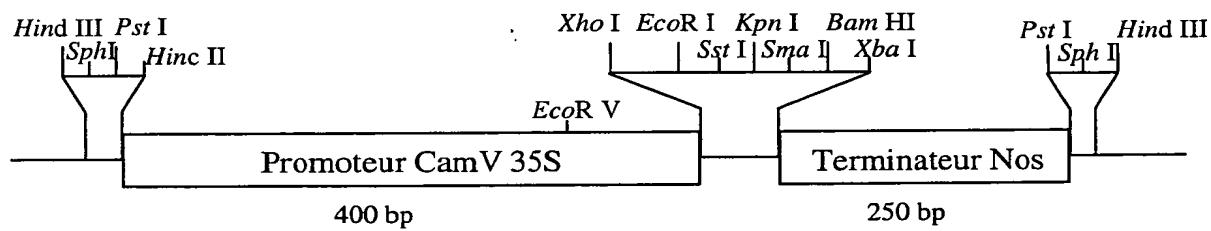
### 2.6.1 Construction du gène rapporteur promoteur *SIRK:GUS*

Le promoteur *SIRK* (3 kpb) a été obtenu par PCR à l'aide d'amorces spécifiques en utilisant comme matrice l'ADN du bactériophage contenant le gène *SIRK*. L'amorce s'hybridant au niveau du codon initiateur de la traduction introduit un site *Nco* I à ce niveau, afin de réaliser une fusion traductionnelle avec la séquence codant l'enzyme GUS. La seconde amorce s'hybride 3 kpb en amont de la première et introduit un site *Xho* I. Le fragment obtenu est cloné dans le plasmide pBluescript. Après une digestion par les enzymes de restriction *Nco* I et *Xho* I, la construction est introduite dans le vecteur pBI 320.X (figure 2.4) digéré par les mêmes enzymes. La construction obtenue est digérée par les enzymes de restriction *Sac* I et *Kpn* I et le fragment libéré est introduit dans le vecteur binaire pBIB-Hygro (figure 2.5A) digéré par les mêmes enzymes.

A

**pBIB-Hygro**

B

**pRT 101****Figure 2.5 : cartes des plasmides pBIB-Hygro et pRT 101.**

**A.** Le plasmide pBIB-Hygro est un vecteur binaire. Le site multiple de clonage est placé du côté de la bordure gauche (Bg). Il est suivi en 3' du terminateur de la nopaline synthase (PolyA Nos). Du côté de la bordure droite (Bd), le gène de résistance à l'hygromycine HPT (sélection des plantes transformées) est sous le contrôle du promoteur de la nopaline synthase. Le terminateur du gène 7 (*PolyA<sub>g7</sub>*) d'*Agrobacterium tumefaciens* lui fait suite. Ce vecteur comporte également un gène de résistance à la kanamycine, sous contrôle d'un promoteur bactérien, pour la sélection bactérienne (non montré). Les tailles des différentes séquences en paires de bases sont indiquées au bas des schémas, et les sites de restriction au-dessus.

**B.** Le site multiple de clonage de pRT 101 est encadré par le promoteur 35S et le terminateur de la nopaline synthase. Les sites de restriction *Hind III*, *Sph I*, et *Pst I* permettent l'excision de l'ensemble de la construction. Le plasmide porte le gène de la résistance à l'ampicilline (non montré).

## 2.6.2 Construction des chimères promoteur 35S-ADNc SOR

Un ADNc codant un canal SOR non fonctionnel a été obtenu par mutagénèse dirigée (§ 2.5.2). Les deux ADNc (sauvage et mutant) ont été excisés du plasmide pBluescript par utilisation des enzymes *Sal* I et *Sac* I et traités par la polymérase du phage T4 de manière à générer des extrémités franches. Ils ont ensuite été phosphorylés par la polynucléotide kinase du phage T4 et clonés dans le plasmide pRT 101 (figure 2.5B; Töpfer *et al.*, 1987) digéré par l'enzyme *Sma* I, de manière à être insérés entre le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur et le terminateur de la nopaline synthase.

Les deux constructions ainsi obtenues ont ensuite été excisées du plasmide pRT 101 par l'enzyme *Pst* I, puis insérées dans le vecteur pBluescript digéré par la même enzyme. Les inserts ont alors été excisés en deux étapes : tout d'abord une digestion par l'enzyme *Apa* I, suivie d'un traitement polymérase/ polynucléotide kinase du phage T4 afin de générer une extrémité franche, puis une digestion par l'enzyme *Sma* I. De même, pBIB-Hygro, le vecteur récepteur final, a été digéré par l'enzyme *Hind* III, traité par les polymérase/polynucléotide kinase du phage T4, puis digéré également par *Sma* I afin de recevoir les inserts.

## 2.6.3 Transformation des agrobactéries

La souche d'agrobactéries EHA 105 (dérivant de EHA 101, Hood *et al.*, 1986) porte un gène de résistance à la rifampicine (rif). Le vecteur binaire pBIB introduit dans ces bactéries porte un gène de résistance à la kanamycine (kan). Les deux antibiotiques sont utilisés à la concentration de 50 µg.ml<sup>-1</sup>.

La souche d'agrobactéries MP90 (GV 3101) porte également un gène de résistance à la rifampicine et contient un plasmide conférant la résistance à la gentamicine (gen). Les antibiotiques sont utilisés aux concentrations de 50 µg.ml<sup>-1</sup> et de 25 µg.ml<sup>-1</sup> respectivement.

### *Préparation des agrobactéries compétentes*

Les agrobactéries sont cultivées dans du milieu LB additionné de rifampicine (pour la souche EHA 105) ou de rifampicine plus gentamicine (souche MP90) pendant une nuit à 30°C. La culture est diluée au 100<sup>ème</sup> dans 200 ml de LB rif-gen. Après 4 h de croissance à 30°C sous agitation, la culture est centrifugée à 4500 g pendant 20 min. Les bactéries sont resuspendues dans 10 ml de TE froid, puis centrifugées à 4500 g pendant 15 min, et resuspendues dans 20 ml de LB froid. Les bactéries sont ensuite aliquotées (500 µl) et congelées dans de l'azote liquide avant d'être stockées à -80°C. Un passage ultérieur à une température voisine de -20°C pendant quelques heures améliore considérablement l'efficacité de transformation des agrobactéries.

Constituants	Milieux		
	C <sub>1</sub> P	GS <sub>1</sub> CA	BFe <sub>2</sub>
Macroéléments	MS/2	NN	MS/2
Microéléments	MS	MS	MS
Fe-EDTA	MS	MS	2xMS
Vitamines/acide aminés	T95	B5	TB95
Caséine hydratée	1 g/l	-	-
Saccharose	30 g/l	60 g/l	20 g/l
Gélifiant	Phytigel 5 g/l	Agar 10 g/l	Agar 7 g/l
Charbon actif	-	2,5 g/l	-
2,4 D	5µM	-	-
NOA	-	10 µM	-
AIA	-	20 µM	-
BAP	1 µM	1 µM	5 µM
pH	6	5,7	6

Tableau 2.1 : composition de différents milieux utilisés pour la culture de cals de vigne.  
 Les abréviations se réfèrent aux milieux précédemment publiés : MS : Murashige et Skoog (1962); B5 : Gamborg *et al.* (1968); NN : Nitsch et Nitsch (1969); T : Torregrosa *et al.* (1995); TB: Torregrosa et Bouquet (1995). L'indication d'un milieu en regard d'un constituant indique que la concentration de ce constituant est celle utilisée dans le milieu indiqué.

### ***Transformation des agrobactéries***

Les agrobactéries sont décongelées dans de la glace pendant 2 h. Le plasmide à introduire (5 µg) est mis en présence des bactéries pendant 10 min dans la glace. Les bactéries sont ensuite plongées dans de l'azote liquide pendant 1 min puis incubées à 37°C pendant 5 min. Cinq cents µl de LB sont ajoutés à la suspension de bactéries. Après 4 heures de culture à 30°C, les agrobactéries sont étalées sur une boîte de Petri contenant du milieu LB rif-gen-kan et 15 g.l<sup>-1</sup> d'agar. Les colonies apparaissent au bout de 2 jours de culture à 30°C.

### **2.6.4 Transformation des plantules d'*Arabidopsis***

#### ***Transformation***

La méthode utilisée est celle décrite par Bechtold *et al.* (1993) et adaptée par Clough et Bent (1998). La culture d'agrobactéries est réalisée dans 500 ml de LB-kan, à partir d'une préculture ensemencée la veille dans du LB rif-gen-kan. Lorsque la culture a atteint la phase stationnaire de croissance (après une nuit), elle est centrifugée à 4500 g pendant 15 min. Les agrobactéries sont resuspendues dans 400 ml d'une solution composée de saccharose 5 % et de silwet L-77 0,05 % (Witco, Organosilicone Group, CH) par une agitation à *ca* 250-300 rpm. Les hampes florales de plantes âgées de 5 semaines sont trempées dans cette solution pendant deux fois 1 min environ. Les plantes sont ensuite placées pendant 24 h dans une enceinte où règne une humidité relative de 100 %, puis elles sont transférées dans une serre jusqu'à la formation des graines.

#### ***Sélection des plantules transgéniques***

Les graines issues des plantes mises en présence des agrobactéries sont récoltées, rendues axéniques et semées sur boîtes de Petri contenant de l'hygromycine (§ 2.1.4). Les plantules résistantes à l'antibiotique sont transférées en terre. La présence du transgène est vérifiée par PCR sur de l'ADN génomique, à l'aide d'amorces spécifiques de la construction introduite.

### **2.6.5 Transformation des cals embryogènes de vigne**

#### ***Transformation et régénération de plantules***

Une culture d'agrobactéries contenant le vecteur à introduire dans les cals est réalisée dans 50 ml de milieu MGL (tryptone 5 g.l<sup>-1</sup>, extrait de levure 2,5 g.l<sup>-1</sup>, NaCl 5 g.l<sup>-1</sup>, mannitol 5 g.l<sup>-1</sup>, L-glutamante 1 g.l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 g.l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0,1 g.l<sup>-1</sup>, Fe-EDTA 8 mg.l<sup>-1</sup>, biotine 5 µg.l<sup>-1</sup>) rif-kan, à partir d'une préculture ensemencée la veille dans du LB rif-kan. Après une nuit à 30°C, la culture est centrifugée à 4000 g., à 4°C durant 15 min, et le culot bactérien est

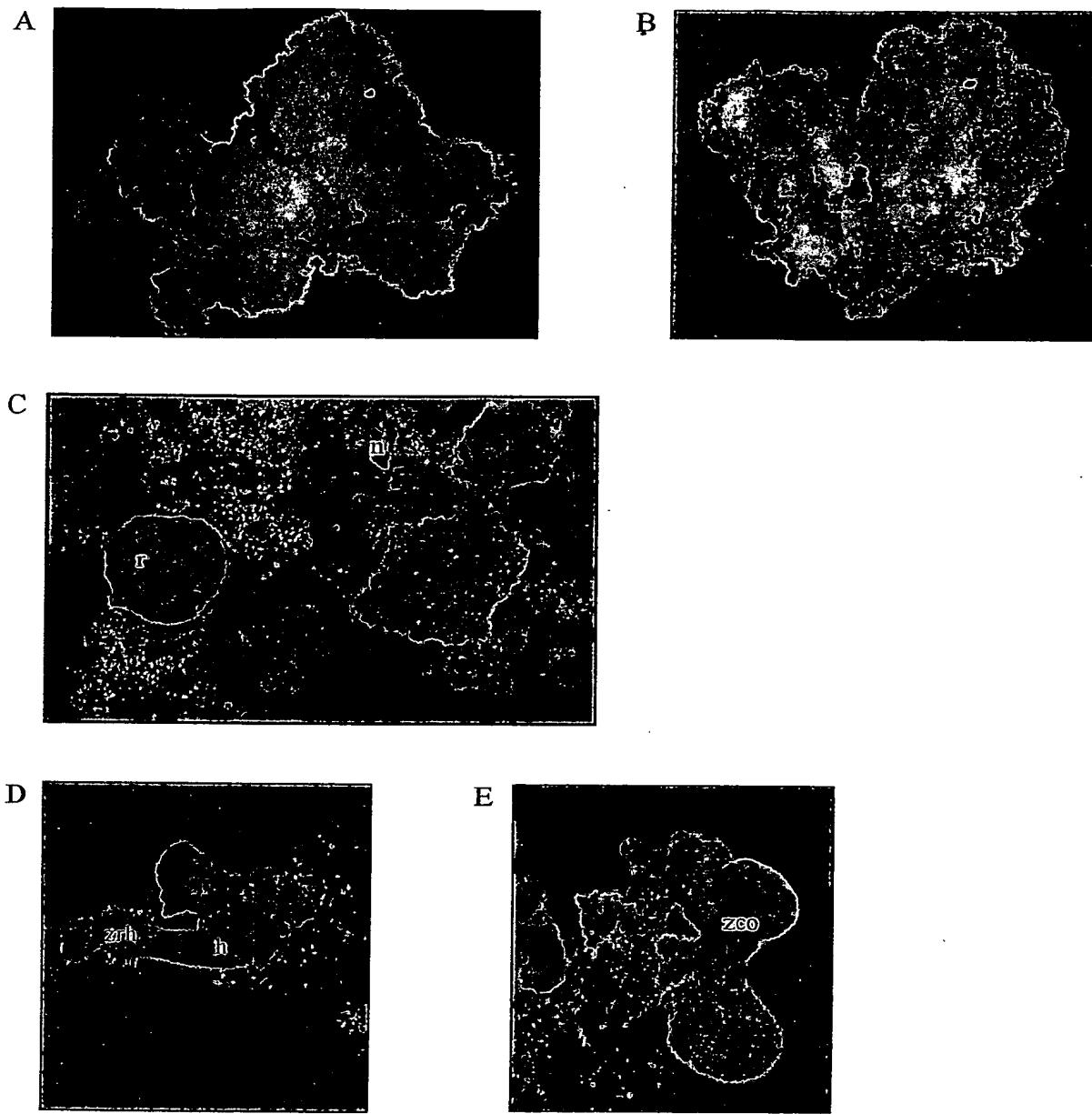


Figure 2.6 : régénération de vignes après transformation de cals embryogènes.

**A** : cals poussant sur milieu  $C_1P$ .

**B** : cals poussant sur milieu  $GS_1CA$ .

**C** : émergence de zones résistantes à l'hygromycine, potentiellement transformées (r). Le reste du cal brunit, se nécrose (n), les cellules n'ayant pas intégré le transgène.

**D** : apparition de l'hypocotyle (h) et de la zone rhizogène (zrh) d'un embryon.

**E** : développement de la zone cotylédonnaire d'un embryon (zco).

resuspendu dans 100 ml de milieu d'induction composé de sels ABB 1X (Guyon *et al.*, 1980), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM, MES 40 mM, glucose 0,5 %, acétosyringone 100 µM, pH 5,6. Après deux heures d'incubation à 28°C sous agitation à 100 rpm, les bactéries sont centrifugées à 4000 g, à 4°C pendant 15 mn et resuspendues dans du milieu LCM (identique au milieu GS<sub>1</sub>CA additionné d'acétosyringone 100 µM, et dépourvu des régulateurs de croissance, d'agar et de charbon actif; Cf. tableau 2.1) de manière à obtenir une suspension d'une DO égale à 0,3 (environ 10<sup>6</sup> bactéries par ml). L'inoculation des cals est faite à raison de 10 ml de suspension bactérienne pour 1 g de cals embryogènes. Les cals sont incubés pendant 10 min après une agitation vigoureuse, puis séparés de la suspension bactérienne par dépôt sur un filtre de Nylon (maille: 100 µm<sup>2</sup>, Millipore), posé ensuite sur un filtre de papier Whattman n°1 stérile. Les cals ainsi "séchés" sont alors transférés sur du milieu de co-culture (GS<sub>1</sub>CA ou C<sub>1</sub>P). La co-culture est réalisée pendant 2 jours à 22°C (Dillen *et al.*, 1997). Les cals sont alors lavés dans du milieu LCM, récupérés sur filtre de nylon, séchés sur du papier Whattman comme ci-dessus, et transférés sur des boîtes de Petri de 55 mm de diamètre contenant du milieu GC<sub>1</sub>CA ou C<sub>1</sub>P additionné de 500 µg.ml<sup>-1</sup> de céfotaxime (Hoescht) et de 200 µg.ml<sup>-1</sup> d'augmentine (Duchefa). Après 3 semaines, les cals sont transférés pour 3 à 4 semaines sur un milieu sélectif (GC<sub>1</sub>CA ou C<sub>1</sub>P additionné de 5 à 25 µg.ml<sup>-1</sup> de hygromycine, selon le génotype). Le repiquage des cals sur ce milieu se fait tous les mois, pendant 3 à 4 mois selon leur croissance. Pendant cette phase de sélection, l'aspect des cals change en fonction du milieu de culture (Cf. § suivant). Ceux qui poussent sur milieu C<sub>1</sub>P ont une couleur blanc cassé-jaune pâle, sont très friables, et prolifèrent rapidement (figure 2.6A). A l'inverse, les cals poussant sur GS<sub>1</sub>CA sont d'un blanc opaque et brillant (figure 2.6B), ils sont très durs et prolifèrent peu; ils tendent plutôt à se différencier. Au cours de la période de sélection, la majeure partie du cal brunit, indiquant une nécrose des tissus qui ne sont pas résistants à l'hygromycine, tandis que des petites parties claires persistent et prolifèrent, suggérant une résistance à l'hygromycine (figure 2.6C).

Afin d'obtenir des embryons potentiellement transformés, les cals sont alors transférés pour 4 semaines sur des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre, contenant du milieu MS/2 additionné de 15 à 25 µg.ml<sup>-1</sup> d'hygromycine, 500 µg.ml<sup>-1</sup> de céfotaxime et 200 µg.ml<sup>-1</sup> d'augmentine, une première fois en étalant les cals sur toute la surface de la boîte, puis une seconde fois en isolant précautionneusement les structures embryogènes en cours de développement. Les embryons germent (figure 2.6D), développant en priorité les parties racinaires (figure 2.6D), puis la zone cotylédonnaire (figure 2.6E), qui verdit progressivement (figures 2.6F et G).

De manière à stimuler la caulogénèse des embryons en germination, les racines, l'hypocotyle et la partie supérieure des cotylédons sont coupés. Une incision est réalisée dans les tissus situés entre les bases des cotylédons, et les embryons somatiques sont enfouis dans le milieu BFe2 (Cf. tableau 2.1) additionné de 15 µg.ml<sup>-1</sup> d'hygromycine, de manière à ce que

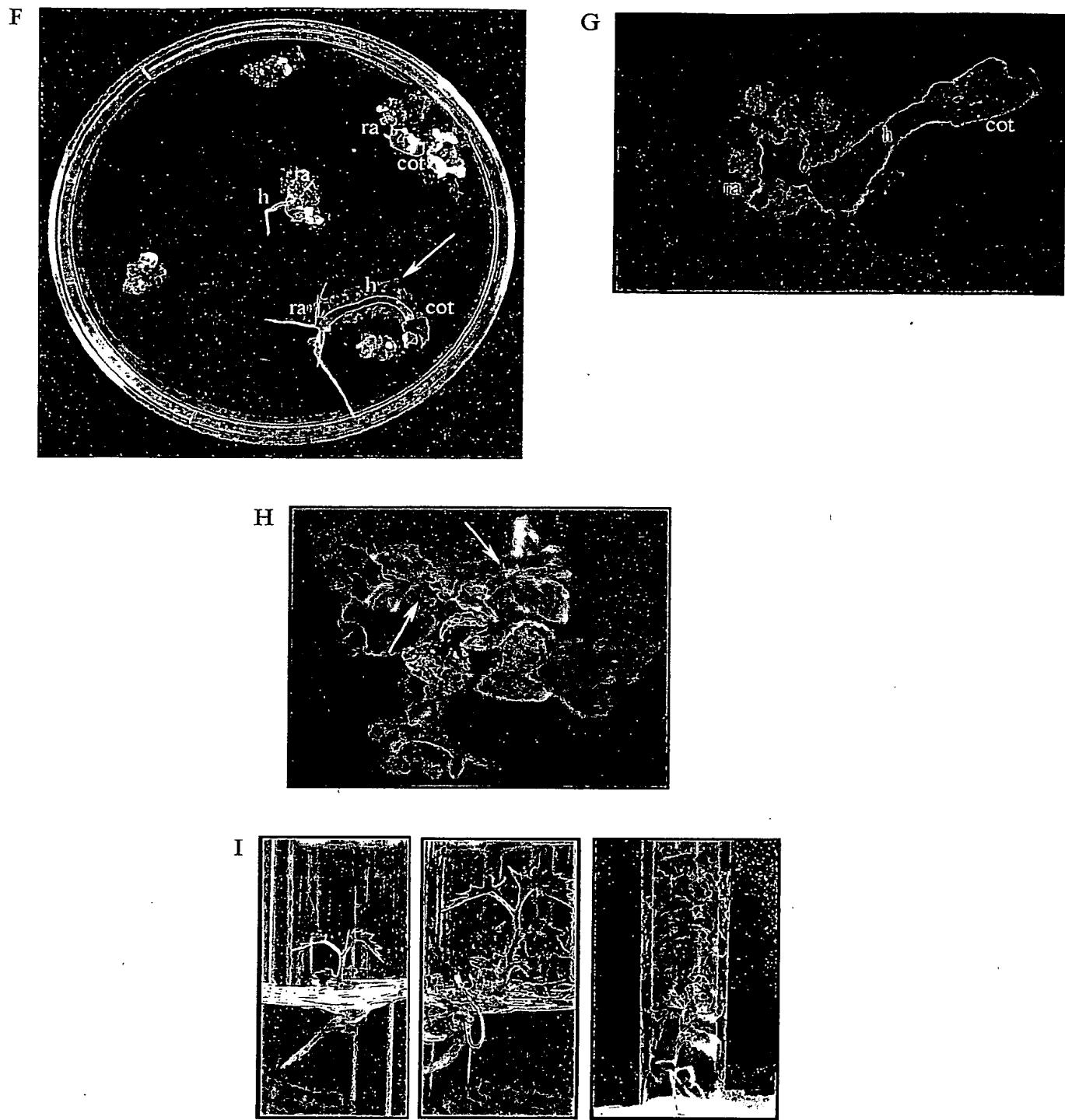


Figure 2.6 (suite).

**F** : divers stades de développement d'embryons. Au centre, apparition de l'hypocotyle (h) et de petites racines (ra). En haut à droite, embryon replié sur lui-même, avec cotylédons verts (cot). En bas à droite, embryon allongé, avec racines, hypocotyle et cotylédons bien développés.

**G** : grossissement de l'embryon développé indiqué par une flèche en F.

**H** : développement de tiges axillaires (flèches) à partir d'un embryon.

**I** : développement d'une tige axillaire et régénération d'une plantule de vigne.

le bourgeon méristématique soit au contact du milieu. Ce milieu est favorable à la multiplication axillaire (figure 2.6H). Les cals sont alors cultivés en lumière atténuee (environ  $15 \mu\text{E.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ), à  $28^\circ\text{C}$ . Lorsque les tiges axillaires émergent, elles sont excisées de la structure embryonnaire et transférées individuellement dans des tubes contenant du milieu d'enracinement pour poursuivre leur développement (MS/2 additionné de  $5 \mu\text{M}$  d'AIA). Les tiges axillaires se développent pour donner des plantules (figure 2.6I). Celles-ci peuvent alors être passées en mode d'acclimatation, en terre, à la serre. Il est également possible de multiplier de manière clonale les individus par micropagation.

### ***Aspects pratiques, adaptations du protocole et résultats***

**Génotype des cals.** Les cals transformés appartiennent à deux génotypes. Le 110R est un porte-greffe hybride *V. rupestris* x *V. berlandieri*. Le Portan est un cultivar créé par l'INRA, par croisement Grenache x Portugais bleu.

**Milieux utilisés.** Dans le but d'optimiser les expériences de transformation et obtenir des résultats dans le cadre de la thèse, nous avons utilisé deux types de milieux pour la culture des cals, choisis parmi les milieux classiquement utilisés (Torregrosa, 1994). Le milieu C<sub>1</sub>P est un milieu sur lequel les cals prolifèrent rapidement. Ils sont alors relativement friables, et ne contiennent que des structures proembryonnaires. Au contraire, le milieu GS<sub>1</sub>CA favorise la différenciation des structures proembryonnaires, ce qui fait que l'état des cals est beaucoup plus hétérogène, avec apparition d'embryons en cours de différenciation (jusqu'au stade torpille). Le processus de régénération des plantules est donc beaucoup plus rapide sur ce milieu. Cependant, ce milieu présente l'inconvénient de favoriser l'émergence de structures chimériques.

**Adaptations du protocole.** Lors des deux premières séries de transformations, les cals étalés sur milieu GS<sub>1</sub>CA sont morts (une très faible proportion de cals de génotype Portan ont survécu). Ils étaient recouverts d'agrobactéries. Ces dernières n'ont pas été éliminées par le lavage suivant les deux jours de coculture, et ont développé une très forte virulence sur le milieu GS<sub>1</sub>CA. Il semble que l'absence de 2,4-D dans le milieu GS<sub>1</sub>CA rende les cals plus sensibles à l'infection bactérienne, comme cela a déjà été montré chez les céréales (Li *et al.*, 1992; Barro *et al.*, 1998) (Torregrosa, communication personnelle). Pour les trois autres séries de transformations suivantes, nous avons rajouté de l'augmentine ( $200 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) dans les milieux de culture, de manière à nous débarrasser des agrobactéries.

Nous avons aussi pu constater que la sensibilité des deux génotypes à l'hygromycine n'est pas la même : pour le Portan, des doses de  $5$  à  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  ont suffit à assurer un bon niveau de sélection, apprécié par le brunissement des cals non transformés, sans affecter la croissance des cals et des embryons. En revanche, pour le 110R, nous avons du appliquer des doses de  $15$  à  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  pour observer un brunissement des cals.

Transformation	Construction	Nombre de lignées transgéniques obtenues
A	pBIB-Hygro	3
	35S:ADNc <i>SOR</i> sauvage	5
	35S:ADNc <i>SOR</i> muté	5
B	pBIB-Hygro	1
	35S:ADNc <i>SOR</i> sauvage	6
	35S:ADNc <i>SOR</i> muté	8
	Promoteur <i>SIRK:GUS</i>	4
C	35S: <i>GUS</i>	2
	35S: <i>GUS</i>	5
	Promoteur <i>SIRK:GUS</i>	4
D	Promoteur <i>SIRK:GUS</i>	4

Tableau 2.2 : nombre de lignées transgéniques obtenues par construction et par série de transformation.

Les 4 premières séries de transformation ont été analysées, et sont appelées chronologiquement A, B, C, D. Nous ne pouvons pas encore dresser le bilan de la cinquième. Détail des constructions: pBIB-Hygro : transformation par le vecteur pBIB-Hygro vide; 35S:ADNc *SOR* sauvage : l'ADNc *SOR* sauvage est placé sous le contrôle du promoteur 35S; 35S:ADNc *SOR* muté : l'ADNc *SOR* muté est placé sous le contrôle du promoteur 35S; 35S:*GUS* : le gène rapporteur *GUS* est placé sous le contrôle du promoteur 35S; promoteur *SIRK:GUS* : le gène rapporteur *GUS* est placé sous le contrôle du promoteur du gène *SIRK*.

Evolution des cals. Les cals de 110R (cultivés sur milieu C<sub>1</sub>P) n'ont pas formé de régénérants. Au fur et à mesure de leur culture sur milieu de sélection, ils ont bruni, sans apparition de petites zones blanches indiquant la résistance à l'hygromycine et donc un événement potentiel de transformation. Malgré un temps de culture très prolongé par rapport aux cals de Portan, aucune structure embryonnaire n'est apparue.

D'autre part, nous avons constaté que les cals des deux génotypes déposés sur milieu C<sub>1</sub>P ont bruni, sans vraiment présenter de début de différenciation et donc sans germination d'embryon. Les cals survivants des premières séries de transformations étalés sur milieu C<sub>1</sub>P ont donc été transférés sur milieu GS<sub>1</sub>CA, tandis que pour les dernières séries, les cals n'ont été déposés que sur ce milieu.

Analyse des transformants. Les transformants que nous avons finalement obtenus sont tous de génotype Portan. Dans la majorité des cas, nous disposons d'au moins 3 plantules par événement indépendant (*a priori*) de transformation (tableau 2.2). Chacune de ces plantes a été vérifiée par PCR de façon à s'assurer qu'elle contient bien la construction transgénique. Au total, 40 à 60 % des plantules obtenues comportaient la construction, ce qui constitue un rendement plus faible que celui observé habituellement, et qui peut être dû au fait que nous avons un peu hâté la régénération des plantules, aux dépens de la sélection.

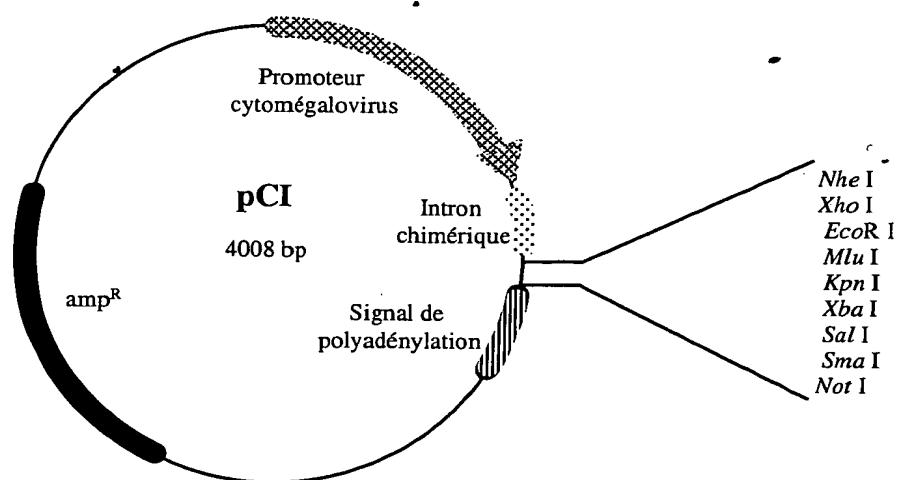
Les tests auxquels les plantules ont ensuite été soumises (test GUS ou tests de croissance pour les mutants dominants négatifs) sont décrits dans les chapitres 5 et 6.

## 2.7 Analyse de l'activité GUS dans les plantes transgéniques

La coloration histochimique est réalisée selon le protocole décrit par Lagarde (1996). Les plantules sont pré-fixées pendant 30 min sous vide dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,2 contenant 1,5 % (v/v) de formaldéhyde et 0,05 % (v/v) de Triton X100. Elles sont rincées 3 fois dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,2, Triton X100 0,05 %. La réaction de coloration a lieu à 37°C dans une solution contenant du tampon phosphate 50 mM pH°7,2, du Triton X100 0,05 %, du ferrocyanure de potassium 0,5 mM, du ferricyanure de potassium 0,5 mM et du X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-glucuronide) 1 mM.

En fin de réaction, les tissus sont fixés à 4°C pendant 24 h dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,2 contenant 2 % de paraformaldéhyde, 1 % de glutaraldéhyde, 1 % de caféine et 0,05 % de SDS. Ils sont ensuite déshydratés par passage dans successivement 2 bains d'éthanol 95 % (15 puis 30 min), puis 4 bains d'éthanol 100 % (15, 30, 60 min puis une nuit). Les tissus sont ensuite conservés dans de l'éthanol 100 %. Ils peuvent alors être observés à la loupe binoculaire ou au microscope. Les coupes semi-fines ont été effectuées avec un Vibracut (Biorad).

A



B

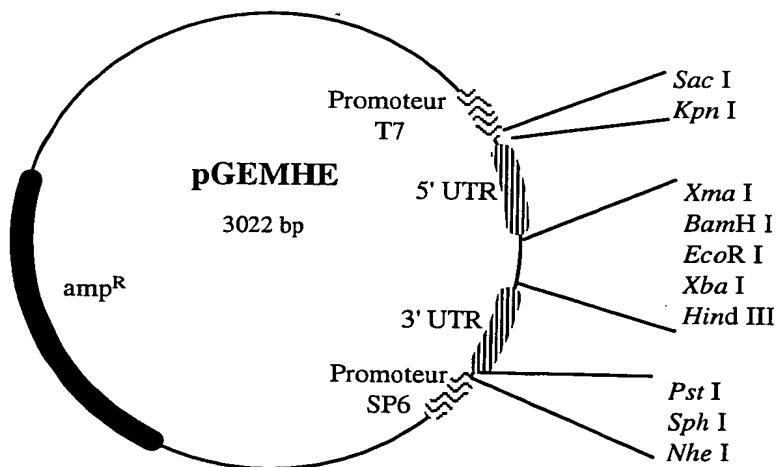


Figure 2.7 : carte des plasmides pCI et pGEMHE.

A. Le plasmide pCI est un vecteur d'expression directe. Il contient le promoteur d'un gène précoce-immédiat du cytomégalovirus humain, suivi d'un intron chimérique (composé d'un fragment du premier intron du gène de la  $\beta$ -globine humaine et d'un fragment d'un intron d'un gène d'immunoglobuline) permettant d'augmenter le niveau d'expression de l'ADNc cloné dans le site multiple de clonage adjacent. Le site de polyadénylation provient du gène T du virus SV40. Le gène de résistance à l'ampicilline permet la sélection bactérienne.

B. Le plasmide pGEMHE est un plasmide de transcription *in vitro*. Il comporte les promoteurs des ARN polymérasées des bactériophages SP6 et T7. La transcription est initiée à partir du promoteur T7. Les régions 5' et 3' UTR du gène de la  $\beta$ -globine du xénopé permettent d'augmenter la stabilité des ARNc produits. Le gène de résistance à l'ampicilline permet la sélection bactérienne.

## 2.8 Caractérisation électrophysiologique des canaux exprimés dans les ovocytes de xénope

### 2.8.1 Les plasmides d'expression

Deux types de plasmides ont été utilisés pour la caractérisation des canaux dans l'ovocyte de xénope.

#### *Le plasmide d'expression pCI*

Le plasmide d'expression, pCI (figure 2.7A; Promega), dans lequel sont clonés les ADNc à analyser, est directement injecté dans l'ovocyte. Ce plasmide a été choisi pour trois raisons : (i) il a été montré que certains canaux ne sont pas exprimés suite à l'injection de transcrits *in vitro* alors qu'ils le sont suite à l'injection de vecteur ADN; (ii) la transcription *in vitro* est longue et coûteuse, de plus, les ARN sont fragiles en comparaison à l'ADN; (iii) il peut être utilisé dans différents systèmes (ovocyte de xénope, cellules COS...).

La solution d'ADN (1 µg/µl) est injectée dans le pôle animal (pôle noir) car le noyau de l'ovocyte se trouve de ce côté. Le pourcentage d'ovocyte exprimant des canaux dans ces conditions est compris entre 30 et 60 %. Pour améliorer ce rendement, il est possible de centrifuger les ovocytes pour faire apparaître le noyau et injecter spécifiquement dans ce dernier.

#### *Le plasmide pGEMHE- transcription in vitro*

Ce plasmide de transcription (figure 2.7B; Liman *et al.*, 1992) est spécialement conçu pour la production d'ARNc devant être traduits, après microinjection, dans l'ovocyte. Les transcrits obtenus *in vitro* (voir ci-dessous) par l'ARN polymérase du phage T7 comportent la séquence 5' flanquante de la β-globine de xénope, suivie de la séquence complémentaire de l'ADNc, puis la séquence 3' flanquante de la β-globine, et une séquence polyA (32 nucléotides).

Le protocole suivi est celui préconisé par le fournisseur du kit de transcription (Promega, Riboprobe II Core System-T7 RNA Polymerase™). En résumé, le plasmide pGEMHE dans lequel est cloné l'ADNc à transcrire est linéarisé par digestion enzymatique (*Nhe* I). Le milieu réactionnel utilisé pour la transcription est obtenu en introduisant les réactifs suivants (dans l'ordre indiqué) dans un microtube : 10 µl de tampon de transcription 5 X (kit Promega), 5 µl de DTT 100 mM<sup>-1</sup>, 5 µl de BSA acétylée (Biolabs) 1 mg.ml<sup>-1</sup>, 50 U de RNAsin (Promega), 2,5 µl de rATP 10 mM, 2,5 µl de rCTP 10 mM, 2,5 µl de rUTP 10 mM, 2,5 µl de rGTP 1 mM, 5 µl de m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G, 5 µg de matrice linéarisée, 40 U de T7 RNA polymerase, et de l'eau (préalablement traitée au DEPC), de façon à ajuster le volume final à 50 µl. Le mélange est incubé à 37°C pendant 1 h, puis 40 U d'ARN polymérase T7 sont

rajoutés pour une deuxième heure d'incubation. Le plasmide matriciel est éliminé par un traitement avec 5 U de DNase (BRL) à 37°C pendant 15 min. La préparation est ensuite extraite une fois avec un volume de PCI pH 4,5, et deux fois avec un volume de mélange CI. Les ARNc sont précipités par 2,5 volumes d'éthanول en présence de 0,5 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M. Après centrifugation, le culot est repris dans 20 µl d'eau stérile. Les ARN sont dosés au spectrophotomètre (absorbance mesurée à 260 nm). La taille des ARNc est vérifiée par migration dans un gel d'agarose dénaturant, de la même manière que pour les ARN extraits de tissus (§ 2.3.3).

## 2.8.2 Expression dans l'ovocyte de xénope

### *Obtention des ovocytes et injection des ARNc*

Des *Xenopus laevis* femelles adultes en provenance d'Afrique du Sud ont été achetées à l'élevage du CRBM (CNRS, Montpellier). Elles sont élevées au laboratoire dans des bacs en plastique avec couvercle translucide, placés dans une enceinte climatisée à 20°C avec une alternance jour/nuit de 12 h/12 h. Ces bacs contiennent une solution contenant 0,7 g.l<sup>-1</sup> de NaCl, 10 mg.l<sup>-1</sup> de KCl et 20 mg.l<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>. Les xénopes sont nourris, deux à trois fois par semaine, avec des petits morceaux de cœur de bœuf dégraissé et des granulés destinés à l'alimentation des truites d'élevage.

Pour obtenir les ovocytes, un xénope est anesthésié par immersion pendant 20 min dans un bain de glace pilée. L'animal est ensuite étendu sur le dos, sur un lit de glace pour être opéré. La peau et la paroi musculaire abdominale sont incisées dans le bas de l'abdomen, sur le côté. Un ou plusieurs lobes ovariens sont coupés et placés dans une solution de NaCl 82,5 mM, KCl 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES-NaOH 5 mM pH 7,4. Ensuite, la paroi musculaire puis la peau de l'animal sont chacune recousues avec du fil chirurgical (les prélèvements chirurgicaux d'ovocytes doivent être espacés d'au moins 1 mois sur un même animal, en changeant de côté à chaque fois).

Un traitement à la collagénase (type IA, Sigma) est effectué pour éliminer l'épithélium ovarien et les cellules folliculaires : 2 mg.ml<sup>-1</sup> de collagénase sont ajoutés à la solution précédente dans laquelle les lobes ovariens ont été divisés en "grappillons" contenant une quinzaine d'ovocytes. Après 1 h de traitement sous agitation à 19°C, les ovocytes sont rincés et placés dans du milieu "ND96 modifié" contenant NaCl 96 mM, KCl 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, Na-pyruvate 2,5 mM, HEPES-NaOH 5 mM (pH 7,4) complémenté avec 50 µg.ml<sup>-1</sup> de gentamicine (Sigma). Les ovocytes aux stades de développement V et VI (pôle animal noir parfaitement différencié du pôle végétatif jaune) (Dumont, 1972) sont sélectionnés sous loupe binoculaire et placés dans le milieu ND96 modifié.

Le lendemain, les ovocytes reçoivent une injection d'eau ou de solution d'ARNc ou d'ADN de concentration variable (0,2 à 2 µg.ml<sup>-1</sup>). La solution à injecter est d'abord aspirée dans la pointe d'une micropipette (diamètre de pointe 10-15 µm) montée sur un micromanipulateur mécanique (Prior). Cinquante nl environ (15 nl pour l'injection d'ADN) sont injectés dans chaque ovocyte à l'aide d'un injecteur pneumatique. L'injection des ovocytes se fait sous loupe binoculaire (x40, Olympus). Les ovocytes injectés peuvent être maintenus en vie une semaine à 19°C dans le milieu ND96 modifié. Les ovocytes endommagés sont éliminés quotidiennement.

### **Voltage clamp à deux électrodes**

La conductance de l'ovocyte est étudiée au moins 48 h après l'injection. Les expériences sont faites à température ambiante (20-22°C). L'ovocyte est placé dans une petite cuve en Plexiglas. Un courant de solution expérimentale y coule par gravité. La cuve possède 13 entrées indépendantes reliées chacune par un fin tuyau à un réservoir de solution. Ce système réduit le volume mort lors d'un changement de solution. Nous avons vérifié que le renouvellement effectif de solution expérimentale dans la cuve s'opère en moins de 5 s.

La technique d'enregistrement utilisée est celle du voltage-clamp à 2 microélectrodes intracellulaires et une microélectrode de bain (pour la correction de la chute de potentiel dans la résistance série du bain). Les deux microélectrodes intracellulaires ainsi que la microélectrode de bain sont étirées à partir de tubes micro-hématocrites en verre de soude (Modulohm, Vitrex, A/S réf. 1602) et sont remplies d'une solution de KCl 3 M. La résistance de ces microélectrodes est comprise entre 0,5 et 1,5 MΩ dans une solution de KCl 100 mM. L'électromètre est un Axoclamp 2A (Axon Instruments, USA). Les sondes préamplificatrices que nous utilisons sont de type HS-2. Le rapport d'amplification (mA/mV) est H=1 pour la microélectrode de mesure du potentiel de membrane (électrode 1), H=10 pour la microélectrode d'injection de courant (électrode 2), H=10 pour la connexion avec l'électrode de bain ("bath probe"). L'électrode de référence est connectée au bain à travers un pont salin (KCl 3 M gélosé à 1 %), placé dans une cuve de trop plein en aval de l'ovocyte. Les 3 microélectrodes sont manœuvrées à l'aide de micromanipulateurs mécaniques (Narishige, MM33), sous contrôle visuel à la loupe binoculaire. L'éclairage de l'ovocyte est obtenu à l'aide d'une fibre optique annulaire adaptée autour de l'objectif double de la loupe. La cuve et les micromanipulateurs supportant les sondes de l'électromètre sont placés sur une table isolée des sources extérieures de vibrations. La cuve, les micromanipulateurs et la loupe binoculaire se trouvent à l'intérieur d'une cage de Faraday.

Le programme pCLAMP 6.0.3 (Axon Instruments) exécuté sur un micro-ordinateur de type AT 486, interfacé (TL1 DMA Interface, Axon Instruments) avec l'électromètre, permet le contrôle du potentiel de membrane, ainsi que l'acquisition et l'analyse des données. Nous

avons systématiquement enregistré, en plus du courant, le potentiel au niveau de l'électrode 1, et utilisé les valeurs enregistrées (potentiel réellement obtenu dans l'ovocyte) plutôt que les valeurs imposées. En effet, des écarts de 1 à 5 mV existent pour les plus forts niveaux de courant ( $\leq -6 \mu\text{A}$ ).

Les solutions expérimentales contiennent (sauf cas particulier mentionné sur les figures) :  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM;  $\text{CaCl}_2$  1 mM; HEPES-NaOH 10 mM pH 7,4, ainsi que  $\text{XCl}$  100 mM, X étant un (ou plusieurs) cation(s) monovalent(s) :  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  ou  $\text{Na}^+$ .

### 2.8.3 Patch-clamp

L'ovocyte est placé dans une solution hyperosmotique de  $\text{NaCl}$  200 mM;  $\text{KCl}$  20 mM;  $\text{MgCl}_2$  1 mM; EGTA 5 mM, HEPES-KOH 10 mM pH 7,4. Après quelques minutes, l'ovocyte a dégonflé, permettant un meilleur accès à la membrane vitelline qui est enlevée délicatement à l'aide de pinces d'horloger. L'ovocyte nu est très fragile et doit être manipulé très délicatement sans contact avec l'air qui l'endommagerait irrémédiablement. Il est transféré dans une boîte de Petri en plastique (35 mm de diamètre) contenant la solution de bain :  $\text{KCl}$  100 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, HEPES-NaOH 10 mM, pH 7,4. L'ovocyte est placé au milieu de la boîte, le pôle animal et le pôle végétal étant visibles. En effet, certains canaux ont une expression polarisée (dans un pôle ou dans un autre). Pour les canaux potassiques végétaux, il n'a cependant pas été rapporté d'expression polarisée. Avant de commencer à patcher, il faut laisser l'ovocyte adhérer au fond de la boîte.

Deux types de verre ont été utilisés pour confectionner les pipettes de patch : KIMAX-51 (Kimble Products, USA) et PG165T-10 (Clark Electromedical/Phymep). Les capillaires ont été étirés à l'aide d'une étireuse Sutter P97 en 4 étapes selon un programme adapté à chaque type de verre. Une fois étirée, l'extrémité de la pipette (toute la partie immergée dans la solution excepté quelques micromètres à la pointe) est badigeonnée de "Sylgard" (GE Silicones : 9/10 de RTV 615A et 1/10 de RTV 615B). Une fois étalé, le Sylgard est cuit à l'air chaud (Microforge/Sylgardeuse List Medical, Allemagne). Ce traitement permet d'augmenter le rapport signal/bruit et de diminuer les courants capacitifs. Enfin, pour améliorer la qualité du scellement de la membrane de l'ovocyte sur le verre (le "seal"), l'extrémité de la pipette est rodée à la chaleur d'un filament de tungstène incandescent (Microforge/Sylgardeuse List Medical, Allemagne).

Les solutions de pipette utilisées (sauf mention contraire dans la légende des figures) contiennent :  $\text{MgCl}_2$  1 mM, HEPES-NaOH 10 mM (pH 7,4),  $\text{XCl}$  100 mM (X étant K et/ou Na avec  $[\text{K}]+[\text{Na}]=100 \text{ mM}$ ). Les solutions sont filtrées à l'aide d'un filtre 0,2  $\mu\text{m}$ . La résistance des pipettes ainsi obtenues varie entre 0,8 et 5 M $\Omega$  (valeur mesurée avec le protocole de "test seal" du programme pCLAMP 6,0,3).

Pour la formation du seal, la pipette est approchée par mouvement mécanique du micromanipulateur à quelques millimètres de l'ovocyte. A ce moment, une surpression est appliquée afin de "nettoyer" la membrane de l'ovocyte au point visé. La résistance de la pipette est vérifiée, puis la pipette est rapprochée de l'ovocyte (mouvement piézo-électrique du micromanipulateur, Burleigh, USA) jusqu'à ce que la résistance ait augmenté d'environ 20 %. Une légère aspiration est réalisée à la bouche et maintenue. La vitesse de formation du "gigaseal" (1-100 GOhms) est très variable suivant le lot d'ovocytes et la taille de la pipette (plus la pipette est fine, plus le seal se fait rapidement). Le gigaseal peut être espéré tant que la résistance continue d'augmenter régulièrement. Il est possible d'accélérer la formation du gigaseal. Pour cela, on utilise le programme "TestSeal", qui mesure la résistance passive du courant, et donc la résistance du "seal", en imposant un courant à travers le patch. Ce courant permet en plus de favoriser les interactions hydrophobes patch/pipette. On peut faire varier l'intensité et la durée des épisodes du courant imposé : d'une manière générale, le seal se fait mieux avec des épisodes de 100 ms à -50 mV. Les courants capacitifs sont ensuite compensés, et le niveau de bruit rms est vérifié (dans les meilleures conditions, nous avons obtenu un bruit rms inférieur à 0,3 pA).

Deux types d'enregistrements ont été obtenus en patch clamp : des enregistrements de courant macroscopique (jusqu'à plusieurs centaines de canaux dans le patch) et des enregistrements de courants unitaires (de 1 à 10 canaux dans le patch).

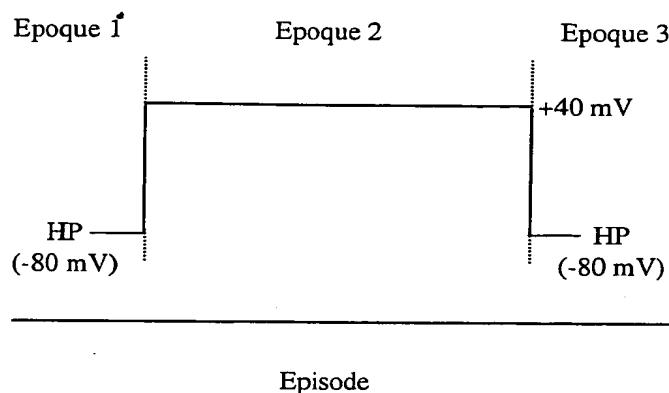
Le programme pCLAMP 6.0.3 (Axon Instruments) exécuté sur un micro-ordinateur de type Pentium, interfacé (Digidata 1200A, Axon Instruments) avec l'électromètre (Axopatch 200A, Axon Instruments) permet d'imposer un stimulus (protocole de voltage imposé) et de mesurer le courant.

#### 2.8.4 Programmes de "voltage-clamp" (potentiel imposé)

Les protocoles utilisés varient suivant les canaux étudiés et les conditions expérimentales. Seules sont présentées ici les grandes lignes des deux principaux protocoles utilisés; les protocoles spéciaux étant expliqués dans les figures correspondantes.

Chaque protocole est composé de plusieurs épisodes (figure 2.8), et chaque épisode comporte plusieurs époques (au moins trois, Cf. figure 2.8). La première et la dernière époque correspondent au potentiel de maintien (HP, "Holding Potential"). La valeur de ce potentiel est choisie de telle sorte que les canaux étudiés soient fermés (par exemple, pour un canal entrant de type KAT1, le potentiel de repos adopté est de -40mV) . Au début de la deuxième époque, un potentiel différent du HP est appliqué. En testant une large gamme de potentiels, il est possible de déterminer le potentiel auquel les canaux s'ouvrent. La durée de la deuxième époque est adaptée aux caractéristiques des canaux étudiés : les canaux Shaker végétaux ayant

A



B

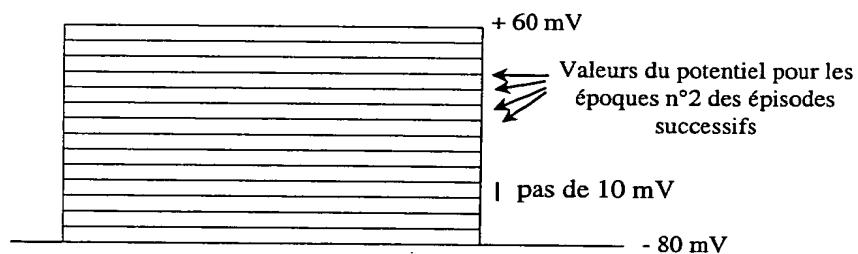


Figure 2.8 : diagramme de protocole I/V.

A. Représentation d'un épisode du protocole. Chaque épisode comprend 3 époques. Pendant l'époque 1, le potentiel prend la valeur du potentiel de maintien (HP, -80 mV dans cet exemple). Au cours de l'époque 2, le potentiel est imposé à +40 mV, puis à l'époque 3, il y a retour au potentiel de maintien.

B. Protocole I/V complet utilisé pour la caractérisation du canal SOR. Ce protocole comporte 15 épisodes de 3 époques chacun. Les valeurs des potentiels imposés à chaque deuxième époque sont comprises entre +60 et -80 mV. Le saut de potentiel ("pas") entre deux époques n°2 successives est de 10 mV.

une activation lente, la deuxième époque se mesure en secondes. Cette durée permet d'atteindre l'état stationnaire, et éventuellement de mettre en évidence une inactivation des canaux. Le retour au HP (troisième époque) permet d'étudier les caractéristiques d'inactivation des canaux.

Les différences entre les épisodes successifs se situent au niveau du potentiel appliqué à la deuxième époque, le potentiel de repos reste toujours le même. Le pas du saut de potentiel est constant, ce qui est représenté par la structure en échelle du schéma du protocole (figure 2.8). Ce schéma représente en effet la superposition de tous les épisodes du protocole. Cette représentation a été adoptée pour permettre un gain de place.

### ***Protocole standard I/V***

Le diagramme typique d'un protocole I/V est présenté figure 2.7. Pour le canal SOR (chapitre 4) le potentiel de maintien généralement utilisé est -100 mV, et de -40 mV pour SIRK (chapitre 5).

Ce type de protocole permet notamment de déterminer la valeur de courant à l'état stationnaire en fonction du voltage et d'étudier la cinétique d'activation du canal.

### ***Protocole de queue : tail***

Dans ce type de protocole, après l'époque au potentiel de maintien (époque 1), la deuxième époque est réalisée à une valeur de potentiel où les canaux sont ouverts. Cette valeur est la même pour tous les épisodes (+40 mV pour SOR; -150 mV pour SIRK). Au cours de la troisième époque, la valeur de potentiel est changée pour chaque épisode. Si cette époque est suffisamment longue, l'état stationnaire peut être atteint. La dernière époque est un retour au potentiel de maintien.

Ce protocole permet d'avoir accès : (i) au potentiel d'inversion du courant (valeur de potentiel où le courant est nul), (ii) aux constantes de temps de désactivation du canal, et également (iii) à la valeur du courant à l'état stationnaire.

#### **2.8.5 Détermination de la conductance unitaire du canal**

La distribution des points expérimentaux (valeurs prises par le courant au cours de l'enregistrement) peut être représentée sous forme d'histogrammes d'amplitude. Le domaine de variation du courant est divisé en intervalles égaux de largeur "di" (dimension en pA). Pour chaque intervalle, on calcule la fréquence, c'est à dire le nombre de valeurs trouvées dans celui-ci sur le nombre total de valeurs étudiées. Cette représentation produit autant de pics que

de l'on détecte de niveaux discrets de courants sur l'enregistrement. Les fluctuations aléatoires du courant autour de ces niveaux discrets (le "bruit") se répercutent sur la largeur des pics. L'enveloppe de chaque pic est une fonction de Gauss. Cette partie de l'analyse est réalisée avec le programme WINASCD (Guy Droogmans, Université de Louvain, Belgique). La conductance unitaire est l'écart entre le pic correspondant au courant de "fuite" à travers la résistance de seal (tous les canaux fermés) et le pic correspondant au courant à travers un canal ouvert (généralement le deuxième pic est voisin du précédent).

### 2.8.6 Mesure du pH intracellulaire de l'ovocyte

Pour mesurer le pH intracellulaire ( $pH_i$ ) de l'ovocyte, nous avons utilisé des microélectrodes sélectives au  $H^+$ .

Des capillaires de 2 mm de diamètre extérieur en borosilicate (Clark Electromedical Instruments) sont lavés par trempage pendant 24 h dans une solution détergente (Extran MA 02 neutral à 10%, Merck), puis rincés, mis à bouillir 2 h dans de l'eau désionisée et séchés au four à 230°C pendant 2 h. Ces capillaires sont ensuite étirés (étireuse Narishige, Japon, référence PE2, courant 16 A, force 2) pour obtenir des micropipettes d'un diamètre de pointe de 1 à 2  $\mu m$ .

Il est nécessaire de rendre la paroi interne des pipettes hydrophobe par le dépôt d'un film de silicone. Pour cela, nous disposons d'une petite cuve en dural (alliage léger d'aluminium, de cuivre, de magnésium et de manganèse) dont le couvercle est percé de trous. Les extrémités non étirées des pipettes sont enfoncées dans ces trous de façon à ce que l'intérieur de la cuve communique avec l'intérieur des pipettes. Une solution de silicone (Fluka, 40  $\mu l$  pour 8 pipettes) est injectée dans la cuve alors que celle-ci et les pipettes ont été chauffées 1 h à 230°C. La solution de silicone se vaporise instantanément. On laisse les vapeurs se condenser à l'intérieur des pipettes pendant 6 minutes. Puis, le film de silicone est cuit 1 h à 130°C. Les pipettes siliconées sont conservées à l'abri de la poussière et de l'humidité.

Quelques heures avant l'expérience, 0,15  $\mu l$  de "cocktail" (*i.e.* une préparation commerciale contenant le transporteur spécifique dans une phase hydrophobe : Hydrogen Ionophore Cocktail A; Fluka) est introduit dans la pointe d'une pipette siliconée à l'aide d'une seringue Hamilton de 1  $\mu l$ . La pipette est maintenue verticalement, pointe en bas, pour que le cocktail descende jusqu'à l'extrémité de la pointe. La solution saline qui complète le remplissage est ensuite déposée juste au-dessus du cocktail à l'aide d'un fin capillaire obtenu à partir d'une seringue jetable de 1 ml, étirée après chauffage à la flamme. Cette solution de remplissage est composée de NaCl 70 mM, NaKHPO<sub>4</sub> 17 mM, pH 7 (NaOH).

Les microélectrodes sont calibrées dans des solutions à différents pH (8,5; 7,5; 6,5 et 5,5). Seules les électrodes qui présentent une réponse au pH linéaire avec une pente supérieure

à 55 mV/unité pH (avant et après utilisation) sont retenues. Sur la base de la courbe de calibration, le pHi des ovocytes est calculé comme la différence entre le potentiel de membrane en mV mesuré simultanément avec une électrode remplie de KCl 3 M et le potentiel de l'électrode à pH.

L'utilisation de deux électromètres (Axoprobe et Axoclamp; Axon Instruments, USA) permet l'enregistrement simultané du potentiel de membrane, du courant et du pHi.

Sonde	Numéro d'accession	Taille de la sonde (pb)	Position sur l'ADNc	Domaine protéique
AKT1	AC003105	548	412-960	137-320 (S2-S6)
AKT2	AL021712	644	445-1089	148-363 (S2-milieu R3)
KAT1	AB010698	780	680-1461	226-487 (S4-R4)
KAT2	AL021713	755	427-1182	142-361 (S3-R3)
SKOR	AC018363	510	599-1109	171-341 (S3-début R3)
KCO1	AF175507	1100	0-1100	Protéine entière

Tableau 3.1: sondes utilisées pour le criblage de la banque d'ADNc de baies.

Le numéro d'accession de chaque ADNc d'*Arabidopsis* ayant permis de générer une sonde est précisé. La taille et la position de la sonde sur l'ADNc correspondant sont indiquées en paires de bases. La correspondance en acides aminés et le domaine protéique couvert par ces sondes sont également précisés. S1 à S6 : segments transmembranaires. R3 : domaine de jonction. R4 : domaine de liaison aux nucléotides cycliques (*Cf.* chapitre 1, § 1.5.2).

## Chapitre 3

### Identification de deux séquences de canaux potassiques de vigne

L'approche que nous avons retenue pour isoler des séquences de canaux potassiques repose sur le criblage à basse stringence de banques d'ADN de vigne avec des sondes hétérologues correspondant à différents canaux potassiques d'*Arabidopsis*. Trois banques ont été criblees successivement. La première est une banque d'ADNc provenant de la transcription inverse d'ARN de baies, et la seconde une banque d'ADN génomique. La dernière est une banque d'ADNc de cellules de baies en culture. Ce travail a conduit à l'identification de deux gènes. L'analyse de la séquence de ces gènes indique qu'ils sont effectivement apparentés aux gènes codant les canaux potassiques de type Shaker chez les plantes.

#### **3.1 Criblage de la banque d'ADNc de baies**

##### **3.1.1 Matériel expérimental**

###### *La banque*

La banque d'ADNc utilisée a été préparée par la société Stratagène, pour la société LVMH (Epernay), à partir d'ARN de baies de Pinot noir récoltées à des stades proches de la véraison. Elle nous a été fournie par LVMH. Après transcription inverse, les ADNc ont été clonés dans le site de restriction *EcoR* I du phage  $\lambda$  ZAP II (*Cf. chapitre 2, § 2.2.1*). Les inserts ont une taille moyenne de 1,2 kpb (de 0,5 à 2,7 kpb).

###### *Les sondes*

La banque a été criblee à l'aide de sondes provenant des ADNc codant les canaux potassiques d'*Arabidopsis*. Nous avons choisi d'utiliser ces sondes en les regroupant par "familles". La sonde "AKT" est constituée du mélange de fragments d'ADNc d'*AKT1* (Sentenac *et al.*, 1992) et *AKT2* (Cao *et al.*, 1995; Ketchum et Slayman, 1996) indiqués dans le tableau 3.1. La sonde "KAT" est préparée à partir de fragments des ADNc *KAT1* (Anderson *et al.*, 1992) et *KAT2*

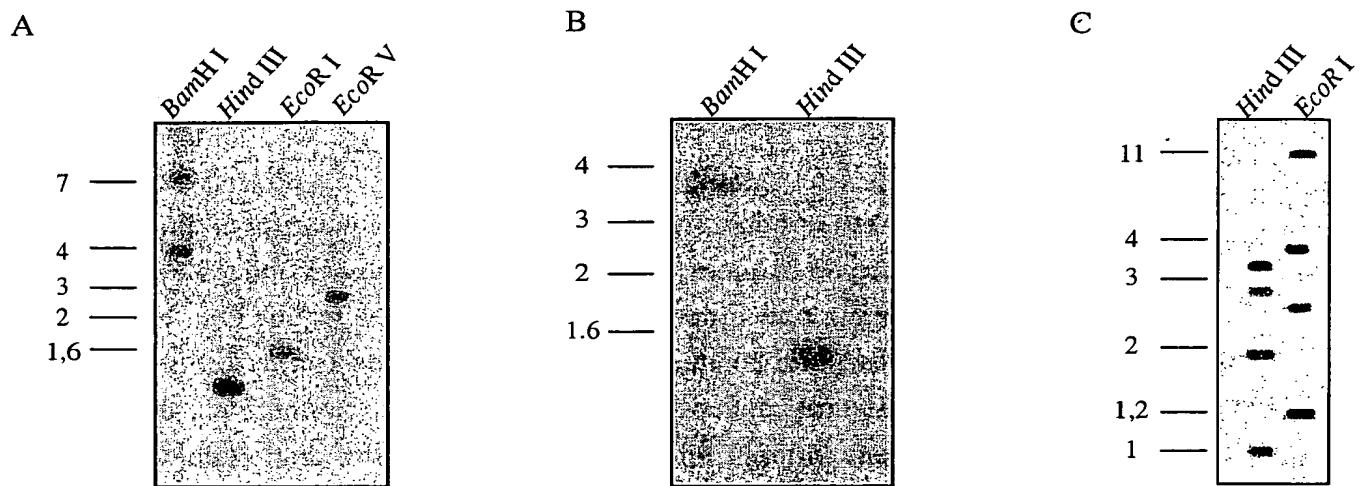


Figure 3.1 : Southern blots d'ADN génomique (cv Ugni blanc) hybridés par des sondes hétérologues correspondant à des canaux K<sup>+</sup> d'*Arabidopsis*.

A. Hybridation par la sonde KAT.

B. Hybridation par la sonde AKT.

C. Hybridation par la sonde SKOR.

Les tailles des marqueurs en kpb sont indiquées sur la gauche des autoradiogrammes. Les enzymes utilisées pour la digestion de l'ADN génomique sont indiquées au-dessus des pistes correspondantes.

(Butt *et al.*, 1997) (tableau 3.1). La troisième sonde, appelée "SKOR-KCO", correspond aux ADNc *SKOR* (Gaymard *et al.*, 1998) et *KCO1* (Czempinski *et al.*, 1997) (tableau 3.1), qui sont tous les deux des canaux à rectification sortante, mais qui n'ont cependant aucune caractéristique structurale commune.

La qualité des sondes ainsi choisies a été testée par la méthode de Southern blot. De l'ADN génomique de vigne, digéré par diverses enzymes de restriction (*Hind III*, *BamHI*, *EcoR I*, ou *EcoR V*) et transféré sur membrane, a été hybridé avec chacune des sondes. Les signaux obtenus après hybridation à basse stringence (hybridation et lavages à 44°C) sont sous forme de bandes discrètes, indiquant que les sondes utilisées reconnaissent des cibles spécifiques dans le génome de la vigne (figure 3.1).

### 3.1.2 Criblage

La banque d'ADNc a été étalée en deux séries de 150 000 phages, à raison de 30 000 phages par boîte de Petri. Sur la première série, 4 répliques (numérotées de 1 à 4) ont été réalisées (Cf. chapitre 2, § 2.2.4). Les membranes 1 et 3 ont été hybridées avec la sonde AKT, et les membranes 2 et 4 avec la sonde KAT. Le deuxième également n'a donné lieu qu'à deux répliques, hybridées avec la sonde "SKOR-KCO". Le fait d'hybrider deux membranes identiques avec la même sonde permet de procéder à deux lavages de stringence différente (Cf. chapitre 2, § 2.2.5), et de vérifier ainsi que malgré la différence de traitement, on retrouve bien des signaux positionnés de manière identique sur l'autoradiographie, variant seulement en intensité. Un signal présent sur une seule des deux membranes est attribué à un artefact, quelle que soit son intensité.

Plusieurs répétitions de ce criblage ont été effectuées. A chaque fois, les signaux positifs sur les deux membranes ont servi à repérer les plages de lyse intéressantes sur les boîtes de culture, et à purifier les clones phagiques correspondants après carottage du fragment d'agar les contenant. Lorsque toutes les plages de lyse isolées fournissent un signal positif sur l'autoradiographie, la pureté du clone est assurée. Il est alors possible d'entreprendre l'analyse de ce clone.

### 3.1.3 Résultats

Un seul clone positif a été obtenu à l'issue du criblage de la banque d'ADNc. Il a été révélé par la sonde "SKOR-KCO". L'hybridation s'est traduite par un signal très intense. Trois étalements successifs ont été nécessaires à la purification de ce clone, le dernier ayant confirmé la pureté du prélèvement précédent.

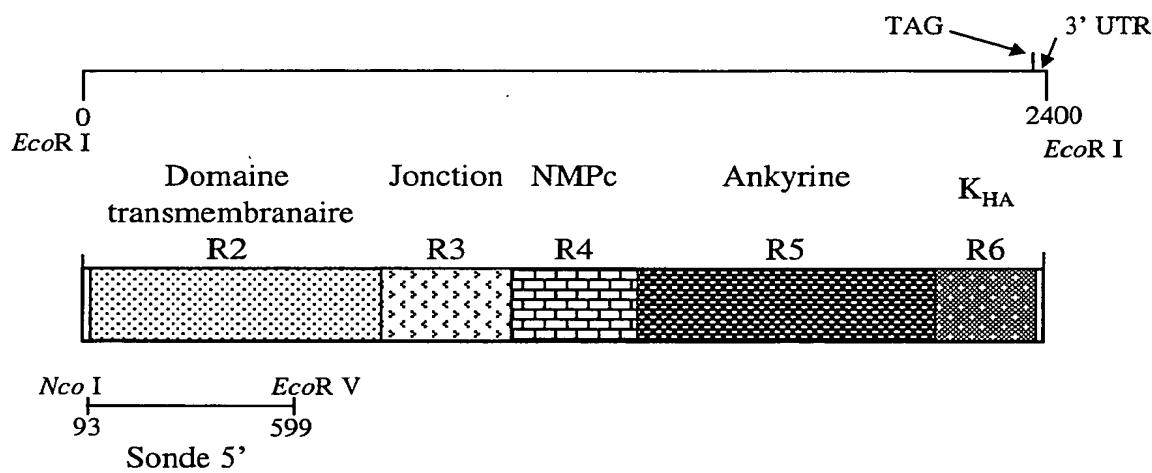


Figure 3.2 : représentation schématique du clone obtenu après criblage de la banque d'ADNc de baies.

Dans la partie supérieure est représenté l'insert du phage cloné au site *EcoR I* du vecteur pBluescript. En 3' de la séquence sont indiqués le site de terminaison de la traduction et la partie disponible de la séquence 3'UTR. La partie médiane du schéma représente la traduction en protéine et les domaines protéiques déduits grâce aux similarités de séquence avec SKOR. La position de la sonde située en 5' ayant servi au second criblage de la banque d'ADNc de baies et au criblage de la banque de cellules de baies en culture est indiquée au bas de la figure.

Le vecteur  $\lambda$  ZAP II utilisé pour construire la banque d'ADNc de baies permet l'excision de l'insert directement sous forme d'un plasmide circulaire, dont le squelette est pBluescript SK+. Le plasmide a été libéré du phage  $\lambda$  ZAP II par excision *in vivo* avec le phage "helper" R408, avant d'être transféré dans la souche d'*E. coli* DH5 $\alpha$  par transformation.

Ce plasmide a alors été amplifié, et l'insert séquencé. Cet insert a une taille de 2,4 kpb. Il est constitué d'un seul cadre ouvert de lecture (figure 3.2). Sa traduction en acides aminés donne un polypeptide présentant 75% de résidus identiques avec la protéine SKOR. Le clone s'arrête une dizaine de pb après le codon stop. Il ne contient donc pas les séquences régulatrices 3' non traduites ni la queue polyA. En 5', il est également incomplet : il commence à un niveau correspondant au résidu 68 de la protéine SKOR (domaine N-terminal), et il ne présente pas de codon initiateur de la traduction potentiel.

## 3.2 Criblage de la banque génomique

### 3.2.1 Procédé expérimental

#### *Banque et sondes*

Le fait de n'avoir isolé qu'un seul clone de la banque d'ADNc de baies nous a conduit à cibler une banque d'ADN génomique. Cette banque a été construite par C. Tesnière (Institut des produits de la Vigne, INRA, Montpellier), dans le vecteur  $\lambda$  GEM 12. Des fragments d'ADN génomique de cultivar Danuta ont été clonés dans le site de restriction *Xho* I du phage après digestion partielle par l'enzyme *Sau* 3A I.

Environ 500 000 phages de cette banque ont été étalés. Cela représente l'équivalent d'environ 10 génomes de vigne, si l'on se base sur une taille moyenne des inserts de 16 kpb (la taille du génome de la vigne est estimée à 475 Mb). Pour ce criblage, la définition des sondes utilisées a été modifiée. Deux sondes ont été utilisées. La première correspond à une sonde mixte regroupant les ADNc complets *AKT1* et *KAT1*, et la seconde est constituée de l'ADNc partiel isolé précédemment.

#### *Criblage et obtention des inserts*

Après 4 tours de criblage, ont été purifiés une vingtaine de clones : une douzaine avec la sonde *AKT1/KAT1*, et 10 avec l'ADNc partiel. Parmi les clones isolés par la sonde *AKT1/KAT1*, seuls 8 ont été analysés en détail. Ces clones fournissaient des signaux d'hybridation d'intensité bien supérieure à ceux fournis par les autres clones.

L'analyse des clones isolés a tout d'abord requis l'amplification de l'ADN phagique, puis son extraction des capsides (*Cf.* chapitre 2, § 2.2.8). L'ADN a ensuite été traité par diverses

enzymes de restriction (*Hind* III, *Pst* I, *Sac* I, *Not* I, *Bam* HI, *Eco*R I), transféré sur membrane de Nylon par la méthode de Southern, et hybridé avec la sonde ayant permis l'identification du clone correspondant dans la banque. Les fragments de restriction détectés par la sonde ont été clonés dans pBluescript SK+ et amplifiés pour être séquencés. Le séquençage de ces fragments a nécessité de multiples sous-clonages, de façon à exploiter la présence de sites de restriction générant des fragments de taille comprise entre 400 et 150 pb. La séquence de tels fragments peut être déterminée en une seule réaction. En l'absence de sites de restriction appropriés, des oligonucléotides de synthèse ont été utilisés comme amorces pour la réaction de séquence.

### 3.2.2 Résultats

#### *Clones révélés par la sonde AKT1/KAT1*

Parmi les 8 clones obtenus avec la sonde AKT1/KAT1, 4 présentent des profils de restriction similaires, avec toutes les enzymes de restriction testées. Ces clones présentent deux fragments de restriction par *Sac* I, de 2,8 et 3,4 kpb, révélés de manière très intense par la sonde. Un cinquième clone présente un fragment de restriction par *Bam* HI de 4 kpb, également fortement révélé par la sonde. Ces fragments ont été clonés dans le vecteur pBluescript SK+ et séquencés. Les trois autres clones, n'offrant pas de fragments de restriction clonables aisément (fragments supérieurs à 12 kpb environ), n'ont pas été davantage caractérisés.

L'analyse de la séquence des trois fragments sélectionnés a montré qu'ils sont les constituants d'un même gène. Les fragments de 2,8 et 3,4 kpb se succèdent. Ils forment la séquence codante, à laquelle succède 1,6 kpb en 3', comprenant les séquences régulatrices 3'UTR, puis des séquences ne présentant pas de similarité particulière avec les séquences des banques de données. Le fragment de 4 kpb comporte le début de la séquence codante (environ 1 kpb) précédée de 3 kpb de promoteur. Le gène reconstitué présente le plus de ressemblance avec les gènes de type KAT.

#### *Clones révélés par la sonde ADNc SOR*

Les clones obtenus avec la sonde correspondant à l'ADNc partiel ont été soumis à la même analyse par restriction. Là encore, certains clones présentaient les mêmes profils de restriction. Des fragments de restriction de tailles variées ont été révélés par la sonde. Le plus grand d'entre eux (10 kpb) a été cloné dans pBluescript SK+, sa taille laissant supposer qu'il contenait toute la séquence codante et probablement une partie du promoteur du gène. L'analyse de la séquence de ce clone sera détaillée au chapitre 4.

### **3.3 Seconde série de criblages de banques d'ADNc**

Dans le but d'obtenir un clone contenant l'ORF complète de l'ADNc cloné précédemment, deux nouveaux processus de criblage ont été entrepris : d'une part, un re-criblage de la même banque d'ADNc de baies, et d'autre part, un criblage d'une banque d'ADNc de cellules de baies en culture (C. Romieu, Institut des Produits de la Vigne, INRA, Montpellier)

#### **3.3.1 Origine de banque d'ADNc de cellules en culture**

La banque a été construite à partir d'ARN extraits de cellules de baies (cv Gamay) en culture (Terrier, 1997), puis soumis à une réaction de transcription inverse. Les ADNc obtenus ont été clonés au site *EcoR* I du vecteur  $\lambda$  ZAP II. La taille moyenne des inserts est estimée à 1 kpb.

Environ 400 000 phages de la banque d'ADNc de baies et 300 000 phages de la banque d'ADNc de cellules en culture ont été étalés.

#### **3.3.2 Les sondes**

La première sonde utilisée est un fragment situé à l'extrémité 5' de la séquence de l'ADNc partiel (figure 3.2), de manière à éviter de sélectionner les clones possédant un insert encore plus court en 5'. Les deux banques ont été également criblées avec une sonde constituée d'un mélange des inserts de 2,8 et 3,4 kpb issus du criblage de la banque d'ADN génomique.

#### **3.3.3 Résultats**

Les deux banques ont été criblées selon le principe décrit au § 3.1.1. Cependant, pour les deux banques et quelle que soit la sonde utilisée, aucun clone positif n'a été détecté à l'issue du premier tour. Il a donc été décidé de se baser uniquement sur l'insert issu de la banque génomique pour déterminer le début de la séquence codante de l'ADNc (Cf. chapitre 4).

### **3.4 Conclusion**

A l'issue de cette série de criblages, nous avons obtenu deux clones dont les séquences (traduites en protéines) présentent de fortes similitudes avec des canaux potassiques d'*Arabidopsis*. Le premier clone est un ADNc incomplet, s'apparentant à SKOR. Le second, constitué de trois séquences génomiques jointives, ressemble aux gènes de la famille KAT. L'analyse plus détaillée de ces deux séquences sera présentée dans les chapitres 4 et 5, respectivement.

Au vu du faible nombre de clones détectés dans la banque d'ADNc de baies, (un seul clone, révélé par la sonde "canaux sortants"), il semble que les gènes de canaux potassiques ne soient pas majoritairement exprimés dans les baies. En particulier, l'absence de clone détecté par les sondes de type KAT et AKT suggère qu'aucun gène de ce type n'est exprimé dans les baies natives (et même dans les cellules de baies en culture), ou l'est de manière trop faible pour pouvoir être détecté par cette méthode.

Il faut cependant noter que nous n'avons pas obtenu de clone de type AKT dans la banque génomique. Un "échappement" est toujours possible, qu'il soit causé par un biais dans la banque, une divergence des séquences un peu plus importante que dans les autres familles de canaux, une interprétation ambiguë sur l'intensité d'un signal d'hybridation... Il est également possible que parmi les clones révélés par les sondes AKT1/KAT1 qui n'ont pas été analysés en détails, certains puissent contenir des séquences de type AKT. Leur étude sera un objectif de la poursuite de ce travail.

## Chapitre 4

### Caractérisation d'un canal potassique à rectification sortante

Le criblage de la banque d'ADNc de baies a permis d'isoler un clone partiel, appelé *VvSOR*, et codant un polypeptide qui présente de fortes identités de séquence avec le canal SKOR. Le fragment cloné ne comporte ni les séquences 3' non traduites, ni le début de la séquence codante. Sa séquence n'a pas pu être complétée par l'obtention d'un autre clone issu de la même banque ou d'une banque d'ADNc de cellules de baies en culture. Deux approches ont donc été menées en parallèle pour obtenir la séquence codante complète : le séquençage du clone obtenu par le criblage de la banque d'ADN génomique en utilisant l'ADNc partiel comme sonde, et la technique de la 5'-RACE. La première approche n'a pas abouti, parce que le clone génomique caractérisé présente un transposon dans sa région 5'. Par contre, nous avons pu obtenir, par 5'-RACE, la séquence manquante dans l'ADNc initial. Nous avons ensuite analysé les caractéristiques fonctionnelles du canal codé par l'ADNc reconstitué et précisé le profil d'expression du gène correspondant.

#### 4.1 Obtention de l'ADNc *SOR* complet

##### 4.1.1 Identification de clones génomiques

Le clone obtenu après criblage de la banque d'ADN génomique (*Cf. chapitre 3, § 3.2*) a été séquencé manuellement, après avoir été sous-cloné à plusieurs reprises, en utilisant diverses combinaisons d'enzymes de restriction. Nous avons ainsi reconstitué une séquence d'environ 5 kpb. Les analyses globales ont montré que ce clone contient effectivement des séquences ressemblant à l'ADNc partiel initial et au gène *SKOR* d'*Arabidopsis*, qui code un canal rectifiant sortant (*Cf. § 1.5.2*). Cependant, une étude plus fine a montré que les séquences des exons potentiels comportent de très nombreuses divergences par rapport à la séquence de l'ADNc partiel. De plus, la séquence codant le segment S5 est absente. Enfin, l'analyse a révélé la présence d'un élément transposable de la famille des rétro-éléments (type Gypsy, Ty3 [Molodell *et al.*, 1983]), inséré en 5' du gène, environ 40 paires de bases en aval du début de l'ADNc partiel. Cet élément n'est plus fonctionnel : il ne comporte que les séquences "gag" et "pol", et a perdu les séquences des protéines d'enveloppe. En revanche, il existe entre les séquences "pol" et le retour à l'ORF *SOR* une zone qui ne présente aucune homologie avec des séquences connues. Cette insertion ne semble donc pas être un événement récent. Cette conclusion est renforcée par les nombreuses modifications dans la séquence du gène que le

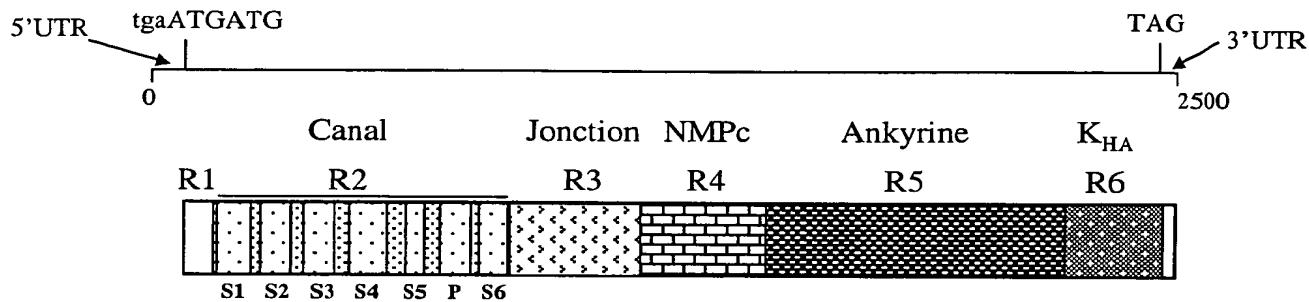


Figure 4.1 : représentation schématique du clone SOR complet.

La partie supérieure représente la séquence nucléotidique de l'ADNc reconstitué par 5'-RACE, avec les sites initiateurs (deux méthionines précédées d'un codon stop) et terminateurs de traduction, et une partie des séquences 5' et 3' UTR. La partie inférieure représente la séquence polypeptidique déduite de l'ADNc et les domaines protéiques potentiels, sur la base des similarités de séquences avec les canaux SKOR et SKOR2 d'*Arabidopsis*.

rétro-élément a inactivé. En outre, les séquences que l'on retrouve en amont de cet élément transposable (à environ 3 kpb en 5' de l'ORF *SOR*) ne présentent pas de similarité avec la séquence codante 5' de l'ADNc partiel.

Le fragment cloné correspond donc à un gène disrupté, qui ne peut permettre de compléter la séquence de l'ADNc. L'analyse d'autres clones repérés dans la banque génomique a montré que ces clones contenaient également l'élément transposable. Ils n'ont donc pas pu être utilisés pour retrouver la séquence complète de l'ADNc partiel.

Dans ce contexte, nous avons criblé une seconde banque d'ADN génomique (cv Pinot Noir, phage EMBL 3 SP6/T7), fournie par le laboratoire de la société LVMH. Huit clones ont été isolés, mais pour des raisons de temps, leur analyse n'a pas pu être poursuivie de manière complète au cours de cette thèse. Néanmoins, d'après les premières données, il semble que l'un des huit phages contienne le promoteur et une partie de la séquence codante du gène.

#### **4.1.2 Obtention du début de la séquence par 5'-RACE**

Nous avons mis en œuvre une approche de 5'-RACE pour obtenir le début de la séquence de l'ADNc. Cette approche est basée sur la transcription inverse d'ARN messagers, les ADNc résultants étant ligaturés à des adaptateurs en 5'. Cela permet d'amplifier ensuite par PCR les séquences 5' des ADNc, à l'aide d'amorces s'hybridant sur ces adaptateurs (détails de la procédure : chapitre 2, § 2.4.2).

Nous avons travaillé à partir d'ARN de cellules de baies en culture (cv Gamay) fournies par A. Ageorges (IPV, INRA, Montpellier). Les ARN totaux ont été extraits à l'aide d'un tampon d'extraction contenant de la guanidine. À la suite des PCR, les produits amplifiés ont été analysés par électrophorèse. Le gel obtenu présente un signal diffus, s'étalant de 300 à 650 pb, avec une bande semblant se détacher à 350 pb. Ce fragment a été cloné dans pBluescript et séquencé. Sa séquence est identique à celle du fragment d'ADNc partiel correspondant, et se prolonge en 5'. Nous avons ainsi pu localiser le site d'initiation de la traduction (figure 4.1). Il se situe 98 pb en amont du premier nucléotide de la séquence de l'ADNc partiel. Ce site comporte deux méthionines à la suite, immédiatement précédées par un codon stop. La séquence du clone isolé par 5'-RACE commence environ 150 pb en amont de la première méthionine. Cela laisse supposer que le site d'initiation de la transcription pourrait se situer à ce niveau. Mais seule l'analyse de la séquence du promoteur pourrait le confirmer.

R1

SKOR 1	MGGSSGGGVSYRSGGRSDVELEDYEVDDFRDGIVESRGNRFNPLTNFL	51
SKOR2		
SOR 1	MMNDWFSVSP	11
1		
SKOR 52	LDFAGGS[GKFT[VINGIRDISRGSI[VHPDN[RWYKAWTM	87
SKOR2 1	MKSEKKLIRWYKAWEM	16
SOR 12	TRQNSHNASTNE[FLGTRHERQKGRHEPDGRWYRTWTK	51

R2

	S1		S2	
SKOR 88	IL[WALYSSFFT[P[EFGFFRGLPEN[L[F		LDIAGQIAFLVDIVL[TFFFVAY	137
SKOR2 17	IL[VWALYSS[LFTPMEFGFFRGLPERL[F		VLDIV[GQIAFLVDIVLQFFFVAY	66
SOR 52	IL[WAVYSSFFT[PMEFGFFRGLPEDL[V[F		LDIAGQIAFLD[DIVL[RFFFAY	101

2

S3

3

SKOR 138	D[SRTYRMVYKRS[SIALRYYLKS[T[F[TIDLTA[CMPWDITIYKAAGEKEEVRYL	187
SKOR2 67	DTQT[YR[TVYKPTRIAFRYYLKS[HFIIMDFIGCFFPWDLIYKASGKHELVRYL	116
SOR 102	DAHTYRMVYKRTSIALRYMKSSFVIDLI[CCTPWDIITYKACGRKEEVRYL	150

S4

S5

SKOR 188	LIRLYRVRVH[VILFFHKMEKD[IRINYLFTRIVKLIFVELYCTHTAACIFY	237
SKOR2 117	WIRLERVRKV[VFFQRLEKDTRINYLFTRILKLTFV[EYCTHTAACIFY	166
SOR 151	WIRLIRVCKVT[DFEQNLEKDTRINYMFTRILKLIAVELYCTHTAACIFY	200

P

SKOR 238	LATTLPAS[QEGYT WIGSLKLGDYSYSK[FREIDLWT[P[YTTSMYFA[VVTMA	287
SKOR2 167	LATTLPPE[NEGYT WIGSLKLGDYSYEN[FREIDLWKRYTTA[LYFAIVTMA	216
SOR 201	LATTLPQ[SEEGYT WIGSLKLGDYSYS[H[FREID[WKRYTTSLYFAIT[TMA	250

4

S6

SKOR 288	V[GYGGDIHAVNMREMIFAMVY[SFDMILGAYLIGNMTALIVK	329
SKOR2 217	V[GYGGDIHAVNLREMIFVMIVYVSFD[VLGAYLIGNITALIVK	258
SOR 251	V[GYGGDIHAVNLREMIFVMIVYVSFD[MILGAYLIGNMTALIVK	292

R3

SKOR 330	SKTERFRDKMAD[YM[YMNRNKLGRN[TR[GQITGHRLQYES[SYTEAAVLQ	379
SKOR2 259	S[TTERFRDKMNNDLIS[SEMMNRK[KLGRD[TR[SQITGHV[RLQYDSHYTD[VMLQ	308
SOR 293	SKTERFRDKMTD[V[KYMNRN[RLD[RD[V[RN[QIKGHRLQYESGYTEASV[TQ	342

5

6

SKOR 380	I[P[SIRAKIAQTLYLPYIEKVPLFRGCS[SEFINQIVIRLHEEF	423
SKOR2 309	I[PASIRAKIAQLLYLPYIKKVPFLKGCS[TEFINQIVIRLHEE	352
SOR 343	[LP[SIRAKIAQTYKPLVEKVSLFRGCS[LELINQIVIRVHEEF	386

R4

1

SKOR	424	L P G E V I M E Q G S V V D Q L Y F V C H G V L E E I G I T K D G S E E I V A V L Q P D H S F G E	473
SKOR2	353	L P G E V I T E Q G N V V D H L Y F V C E G L L E A L V T K T D G S E E S V T L L G P H T S F G D	402
SOR	387	L P G E V I M E Q G N V V D Q L Y F V C H G M L E E I G I G A D G S E E T V L P L Q P N S S F G E	436
CAP		P S K S T L I H Q G E K A E T L Y Y I V K G S V A V L I K D E E G K E M I L S Y L N Q G D F I G E	

<b>SKOR</b>	474	S I L C N I P Q P Y T V R V A E L C R L L R L D K Q S F M N I L E I	508
<b>SKOR2</b>	403	S I T C N I S Q P F T V R V C E L C H L L R L D K Q S F S N I L E I	437
<b>SOR</b>	437	S I L C N I P Q P Y T V R V L E L C R L L R L D K Q S L Q I I L E I	471
<b>CAP</b>		G L F E E G - Q E R S A W V R A K T A C E V A E I S Y K K F R Q L I Q V	

R5

8

**SKOR** 509 F H D G R R I L N N L L E G K E S N V R I K Q L E S D I T F H I S K Q E A D V A L K L N S A A F Y 558  
**SKOR2** 438 F H D G R T I L N N I M E E K E S N D R I K K L E S D I V I H I G K Q E A E L A L K V N S A A F Q 488  
**SOR** 471 F Y D G R R I L N N L L E G K E S N L R V K Q L E S D I T F H I G R Q E A E L A L R V N S A S Y H 521  
**Anky** - G - T P L H - A A - -

6

SKOR	559	D L Y Q L K S L I R A G G D P N K T D Y D G R S P L H L A A S R G Y E D I T L Y L I Q E S V D V N	608
SKOR2	489	D F Y Q L K S L I R S G A D P N K T D Y D G R S P L H L A A C R G Y E D I T L F L I Q E G V D V N	538
SOR	522	D L Y Q L K S L I R A G A D P N K T D Y D G R S P L H L A S A R G E D I V T F L I Q E G V D V N	571
Anky		H - - - V - - L E - - G A - - N - - - - - G - T P L H - A A - - G H - - - V - - L I - - G A N	
		A                    B                    C                    D	

1

SKOR	609	KDKLGSSTPLLEAIKNGNDRVAALLLVKEGATLNIEAGTFLCTVVAKGDS	658
SKOR2	539	KDKFGHTPLFEAVKAGQEGVIGLLVKEGASFNLEDSGNFLCTTVAKGDS	588
SOR	572	SDNFGNTPPLLEAIKNAHDRVASSLLVNKGALLKIDDAGGFCLCTTIANGDS	621
Anky	- - -	- G - TPLH - AA - - GH - - - V - - L L - - GA - - N - - - TPLH - AA - - GH -	

SKOR	659	F L K R L L S N G I D P N S K D Y D H R T P L H V A A S E G F  V V L A I Q L V E - A S A N V L A K	707
SKOR2	589	F L K R L L S S G M D P N S E D Y D H R T P L H V A A S E G F  E F E M A K M L V E - A G A S V I S K	637
SOR	622	F L K R  L S N G I D P N S K D Y D H  T P  H V A A S G R V I F Y G K V A F R K A G A S V F S K	671
		- V - - L L - - G A - - N - - - - G - T P L H - A A - - G H - - - V - - L L - - - G A - - N - -	
		<b>A</b>	<b>D</b>

11

18

SKOR	708	R W G N T P L D E A L G C G N K M L I K L L E D A K N S Q I S S F P S G S K E P K D K V -	752
SKOR2	638	R W G N S P L N E A R L C G N K K L I K L L E D T K N A Q S S I X P T S L R E L Q E E R I	683
SOR	672	R W G N T P L D E G W K C G N K N L M K L L E D A K V A Q L S E F P D C S R E I T D K M -	717
		-- G - T P L H - A A - - G H - - - V - - L L - - G A - - N	

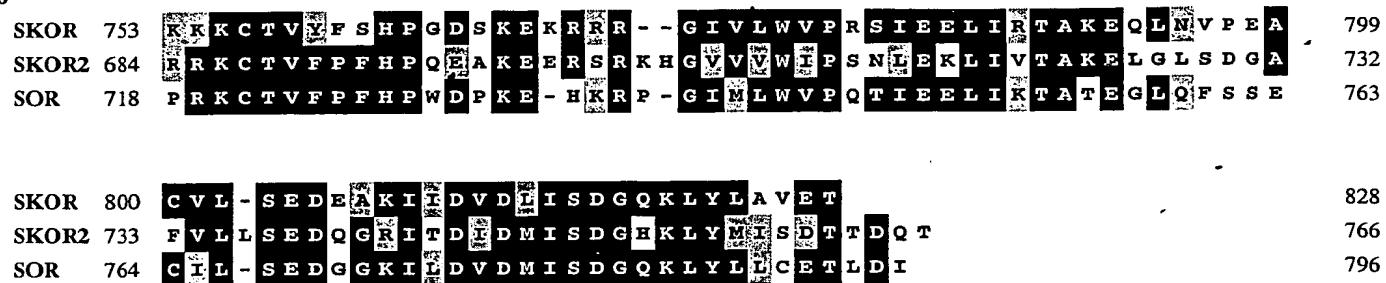


Figure 4.2 : alignement des séquences protéiques des canaux SOR de vigne, SKOR et SKOR2 d'*Arabidopsis*. Les séquences sont alignées région par région. R1 : région N-terminale. R2 : domaine transmembranaire. R3 : domaine de jonction. R4 : domaine potentiel de fixation des nucléotides cycliques. R5 : domaine variable. R6 : domaine K<sub>HA</sub>. La position des segments transmembranaires de la région R2 est indiquée par un trait au-dessus des alignements. Elle a été déterminée en utilisant un programme de prédiction de ces structures à partir de la séquence primaire des protéines. La séquence de la protéine CAP d'*E.coli* a été alignée en-dessous des séquences de la région R4. La séquence du motif ankyrine (Anky, Lux *et al.*, 1990) a été alignée au-dessous des séquences de la région R5. Les nombres à gauche et à droite des alignements indiquent la position de l'acide aminé en regard dans la séquence polypeptidique. Les résidus identiques sont en noir. Les acides aminés appartenant au même groupe de substitution conservative sont indiqués sur fond gris clair. Les 7 groupes de substitution sont : 1: K et R; 2 : D et E; 3 : N et Q; 4 : A et G; 5 : S et T; 6 : I, M, L et V; 7 : F, W et Y. Les tirets correspondent à des décalages introduits pour maximiser les alignements. La position relative des introns dans les gènes codant ces protéines est indiquée par un trait vertical et un numéro placé au-dessus des alignements.

#### **4.1.3 Analyse de la séquence polypeptidique déduite de l'ADNc**

La comparaison de la séquence polypeptidique déduite de l'ADNc complet avec les séquences des différents canaux de type Shaker identifiés chez *Arabidopsis* (Cf. chapitre 1, § 1.5.2) indique que les similarités de séquence les plus fortes sont celles partagées avec les protéines SKOR et SKOR2 (figure 4.2). Les protéines SOR, SKOR et SKOR2 partagent environ 70% de résidus identiques (figure 4.2) et environ 85 % de similarité. Les zones de conservation les plus importantes correspondent au domaine transmembranaire (R2), au domaine de jonction (R3), et au domaine de liaison aux nucléotides cycliques (R5), avec 90 à 95 % de résidus similaires. Au niveau du domaine transmembranaire, les segments S5, P, et S6 sont quasiment identiques, alors que les acides aminés situés entre la fin de S2 et la fin de S4 sont beaucoup plus variables. En particulier, le domaine S4, défini comme un senseur de voltage, présente entre les 3 canaux des remplacements au niveau de résidus chargés, qui pourraient être impliqués dans des différences de la sensibilité au voltage de ces canaux.

Les régions les plus variables entre les 3 canaux sont le domaine ankyrine, et les domaines N- et C-terminaux. Les domaines ankyrine comptent 75 % de similarité, et les domaines C-terminaux 80 %. Le domaine N-terminal est le plus divergent. Il peut être considéré comme formé de deux parties. La première comporte les 13 acides aminés précédant le segment transmembranaire S1. Les séquences de SKOR et SOR y sont fortement similaires : 7 acides aminés identiques et 2 synonymes, soit 69 % de similarité. La séquence de SKOR2 est un peu plus divergente, elle ne compte que 50 % de similarité avec les deux autres. La seconde région comprend les acides aminés en amont de la première région. Elle concerne essentiellement SKOR et SOR, puisque le domaine N-terminal de SKOR2 ne comporte au total que 16 acides aminés, et donc 3 acides aminés seulement affectables à la seconde région. Les polypeptides SKOR et SOR présentent, eux, 76 et 36 résidus dans cette seconde région. Leur alignement fait apparaître seulement deux positions identiques et 3 synonymes. Cette partie du domaine N-terminal correspond donc à la zone la plus spécifique de chacun de ces canaux.

### **4.2 Analyse de la structure du gène *SOR* par PCR**

#### **4.2.1 Approche expérimentale**

L'obtention de la séquence du gène par PCR a d'abord été tentée par une amplification directe de toute la région codante, à partir d'amorces situées aux sites d'initiation et de fin de traduction. Cependant, aucune amplification n'a ainsi été obtenue. Nous avons donc décidé d'amplifier des fragments plus petits et chevauchants de ce gène et de reconstituer ensuite la

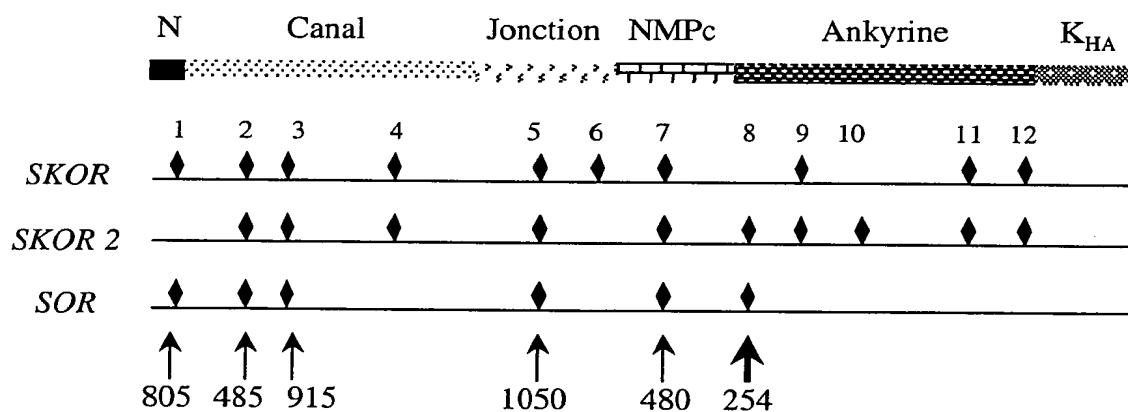


Figure 4.3 : positionnement des introns dans les 3 gènes *SKOR*, *SKOR2* et *SOR*.

Les introns sont positionnés par rapport à la séquence protéique (partie supérieure du schéma). Les losanges noirs indiquent les positions des introns. La partie inférieure positionne les introns séquencés de *SOR* (flèches en traits pleins). La flèche en gras représente un intron caractéristique du sous-groupe *SKOR2* (Pilot, 1999). Les tailles des introns de *SOR* sont indiquées (en paires de bases) par le nombre sous les flèches.

Position des introns	<i>SKOR</i>	<i>SKOR2</i>	<i>SOR</i>
1	CG-G 591		AG-G 805
2	CG-G 83	CG-G 86	AG-G 485
3	AAG- 68	AAG- 457	AGG- 915
4	G-GT 79	G-GT 88	?
5	AAG- 72	AAG- 192	AGG- 1048
6	ATT- 78		
7	TTG- 91	CTG- 79	CTG- 480
8		GAG- 82	GAG- 254
9	TTG- 76	CTT- 66	?
10		G-AT 74	?
11	G-AT 88	G-AG 82	?
12	AG-A 70	CG-A 76	?

Tableau 4.1 : position et longueur des introns des gènes des canaux potassiques *SKOR*, *SKOR2* et *SOR*.

Le numéro du site d'insertion est défini par rapport aux alignements de la figure 4.3. La position de l'insertion dans un codon est figurée par un tiret. La longueur de chaque intron est indiquée sous le codon d'insertion. Les points d'interrogation indiquent que l'information correspondante n'a pas encore été obtenue.

séquence totale. Nous avons testé plusieurs conditions d'amplification, en faisant varier, de façon indépendante ou conjuguée :

- la durée et la température de l'étape d'hybridation de la réaction de PCR,
- l'enzyme utilisée (*Extrapol I* [Eurobio], Taq polymérase),
- les combinaisons de programmes (période de dénaturation au début de la réaction ["hot start"], réduction progressive de la température d'hybridation des amores ["touch down"], gradient de température...),
- la stringence du milieu réactionnel (gammes de concentration de MgCl<sub>2</sub>, de glycérol, de formamide, de DMSO),
- la matrice : ADN génomique de plusieurs cultivars, purifié par des méthodes différentes, et utilisé en quantités variables ( de 0,1 à 50 ng),
- les couples d'amores (longueur des amores, longueur supposée du fragment à amplifier).

Malgré ces tentatives de mise au point, une grande partie du gène n'a pu être amplifiée et reconstituée.

#### 4.2.2 Résultats

Les fragments dont l'amplification était nette ont été clonés et séquencés. Les amores ont été choisies de telle manière que les divers fragments amplifiés soient chevauchant sur des longueurs suffisamment importantes pour pouvoir estimer si des différences de séquence sont significatives (amplification à partir de gènes différents) ou non (erreurs d'amplification, de séquençage..). En effet, l'inconvénient de cette méthode est que la spécificité de l'amplification est réduite si le génome comporte des gènes fortement similaires.

Au total, nous avons pu reconstituer 5,4 kpb de séquence, ce que l'on peut estimer correspondre à environ la moitié du gène. Les séquences ainsi obtenues couvrent les régions correspondant aux domaines protéiques suivants : (i) N-terminal à P; (ii) début du domaine de jonction (R2) au milieu du domaine ankyrine (R5). Dans chacun de ces deux groupes de séquences, 3 introns ont pu être positionnés. La taille de ces introns se révèle exceptionnellement importante (tableau 4.1), par rapport aux longueurs d'introns des gènes de canaux potassiques connus chez *Arabidopsis* (Cf. tableau 4.1 pour la taille des introns des gènes de type SKOR). La comparaison de la position de ces introns avec ceux des gènes *SKOR* et *SKOR2* est présentée sur les figures 4.2 et 4.3. Les positions 2-3-5-7 sont conservées entre les 3 gènes, au nucléotide près (figure 4.2). L'intron 1 est présent chez *SKOR* et *SOR*, mais absent chez *SKOR2*. Par contre, *SOR* ne possède pas l'intron 6, présent uniquement chez *SKOR*. De plus, l'intron 8 est présent chez *SKOR2* comme chez *SOR*, mais pas chez *SKOR*.

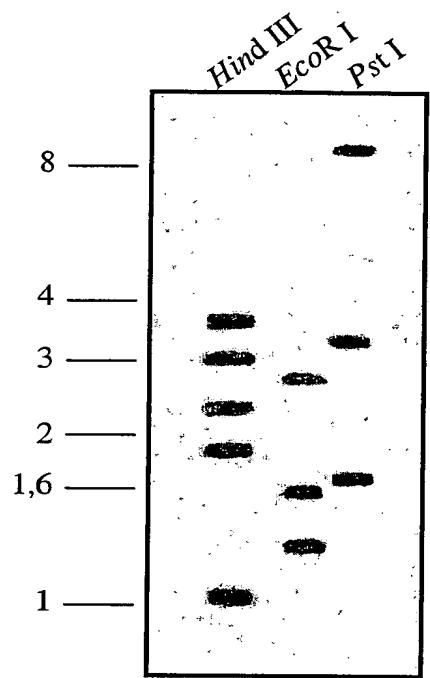


Figure 4.4 : Southern blot d'ADN génomique (cv Pinot noir) hybridé avec une sonde correspondant à l'ADNc *SOR* complet.

Les positions et les tailles des marqueurs en kpb sont indiquées à gauche de l'autoradiogramme. Les enzymes utilisées pour la digestion de l'ADN génomique sont indiquées au-dessus des pistes correspondantes.

Dans leur ensemble, ces observations suggéreraient que *SOR* est l'orthologue chez la vigne du gène *SKOR2* d'*Arabidopsis*.

#### 4.2.3 Nombre de copies du gène

Le nombre de gènes de type *SKOR* présents dans le génome de la vigne a été recherché par Southern blot. Nous avons digéré l'ADN génomique par *Hind* III, *Eco* R I et *Pst* I. Ne disposant pas de la séquence complète du gène, nous ne pouvons cependant pas définir le profil de restriction et d'hybridation attendu dans le cas d'un seul gène de type *SKOR*. Cependant, si l'on se base sur les séquences géniques reconstituées par PCR, la digestion de l'ADN génomique par l'enzyme *Hind* III doit générer une bande de 1100 pb environ.

Les profils présentés sur la figure 4.4 laissent prévoir que plus d'un gène a été révélé par la sonde. En effet, même si l'on admet que le gène *SOR* est très grand (taille estimée à environ 10 kpb), l'addition des tailles des bandes révélées dans le puits *Hind* III donne un total trop important. Il est donc probable que la sonde employée se soit hybridée avec un autre gène de séquence très proche, malgré la stringence des conditions de travail (hybridation et lavages à 65°C). Cela suggère qu'il existe au moins un autre gène de type *SKOR* dans le génome de la vigne.

### 4.3 Caractérisation fonctionnelle de SOR dans l'ovocyte de xénope

L'analyse des caractéristiques fonctionnelles du canal SOR a été réalisée par Benoît Lacombe au Laboratoire, après expression hétérologue dans l'ovocyte de xénope.

Au préalable, nous avons cloné l'ADNc *SOR* complet (reconstitué par 5'-RACE, Cf. § 4.1.2) dans un vecteur permettant son expression dans l'ovocyte. Le vecteur d'expression employé est pCI (Cf. chapitre 2, § 2.8.1). Il contient le promoteur d'un gène précoce du cytomégalovirus, qui permet une expression forte et constitutive.

La construction a été injectée dans le noyau des ovocytes. Les cellules exprimant le canal SOR ont été sélectionnées de manière fonctionnelle, par un épisode d'activation à +40 mV, à partir d'un potentiel de maintien à -100 mV, dans une solution contenant KCl 100 mM (K100). Les ovocytes présentant des courants sortants d'intensité supérieure à 2 µA sont conservés. Ce processus de sélection permet également d'évaluer les valeurs de la conductance potassique et des conductances endogènes parasites.

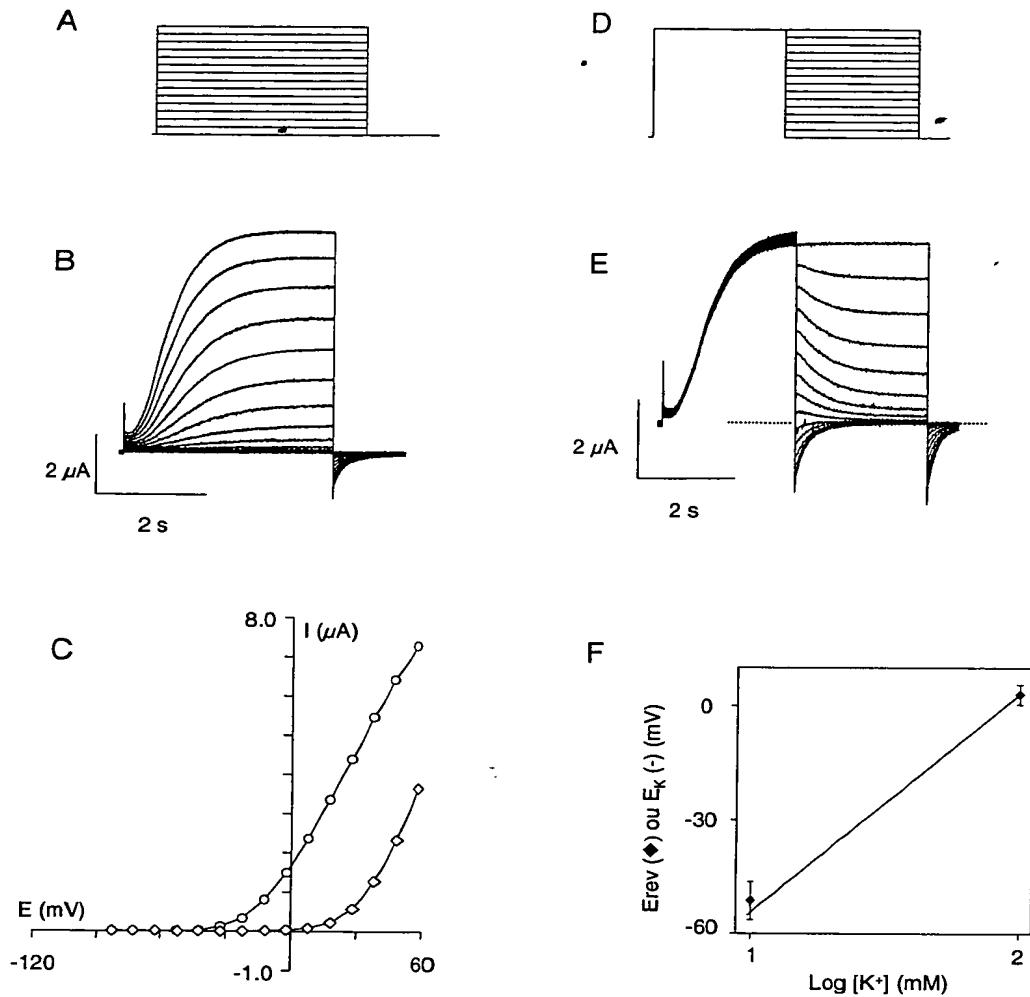


Figure 4.5 : caractérisation fonctionnelle de SOR dans l'ovocyte de xénope par la méthode du voltage-clamp à deux électrodes.

Les ovocytes ont reçu une injection de 10 ng de pCI-SOR 2 à 7 jours avant les enregistrements. La solution de bain contient: XCl 100 mM ( $[\text{X}^+] = [\text{K}^+] + [\text{Na}^+]$ ), CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, HEPES-NaOH 10 mM (pH 7,4).

A. Protocole de voltage imposé. Le potentiel de maintien est de -80 mV. Quinze épisodes successifs de 3,75 s sont imposés à des potentiels allant de -80 à +60 mV par pas de 10 mV.

B. Traces de courant enregistrées en réponse au protocole présenté en (A) dans une solution contenant  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  de  $\text{K}^+$ .

C. Courbes courant-voltage. Les valeurs de courant à l'état stationnaire obtenues pour 2 concentrations externes en  $\text{K}^+$ , 10 ou 100  $\text{mmol.l}^{-1}$  (cercles et losanges respectivement), sont représentées en fonction du potentiel de membrane correspondant.

D. Protocole de voltage imposé à deux époques. Le potentiel de maintien est de -100 mV. Durant la première époque (durée 2,7 s), le potentiel de membrane est de +40 mV. Pour la seconde époque (durée 2,7 s), 15 épisodes successifs sont réalisés à des potentiels allant de -100 à +40 mV (pas de 10 mV).

E. Traces de courant enregistrées en réponse au protocole présenté en (D) dans une solution contenant  $\text{K}^+$  10 mM.

F. Potentiel d'inversion ( $E_{rev}$ ) du courant SOR à 2 concentrations différentes de  $\text{K}^+$  : 10 et 100  $\text{mmol.l}^{-1}$  (losanges; moyenne et ES de 4 mesures indépendantes). La ligne pleine représente le potentiel d'équilibre de  $\text{K}^+$  ( $E_K$ ) calculé avec l'équation de Nernst.

#### 4.3.1 Analyse par voltage-clamp à deux électrodes

La technique du voltage clamp à deux électrodes permet d'analyser les courants macroscopiques sur la membrane de l'ovocyte. Les caractéristiques étudiées dans une première étape ont été la sensibilité du canal au voltage et sa sélectivité ionique. Dans une seconde étape, les effets de la concentration en potassium externe et du pH ont été analysées, et une approche pharmacologique a été initiée.

##### *Sensibilité au voltage*

Les ovocytes sont soumis à des épisodes de dépolarisation dont le protocole est représenté dans la figure 4.5A. A partir du potentiel de maintien de -80 mV, 15 épisodes successifs de 3,75 s sont réalisés. Le potentiel varie au cours de ces épisodes de -80 à +60 mV, le pas entre chaque épisode étant de 10 mV. Après chaque épisode, il y a un retour au potentiel de maintien, qui est conservé pendant 8 s. La concentration de  $K^+$  dans la solution extérieure est de 10 ou 100 mmol.l<sup>-1</sup>.

Le courant observé est un courant de type "sortant". L'activation est lente et de type sigmoïdal (figure 4.5B). L'état stationnaire est atteint en 2 s. Il n'a pas été observé d'inactivation durant des épisodes de dépolarisation prolongés jusqu'à 10 s.

Les valeurs de courant enregistrées à l'état stationnaire sont représentées en fonction du potentiel de membrane correspondant, de façon à obtenir la courbe I/V du canal dans ces conditions (figure 4.5C). En présence de  $K^+$  10 mM, un courant est observé lorsque le potentiel devient moins négatif que -60 mV, une valeur seuil proche du potentiel d'équilibre de  $K^+$  ( $E_K$ ). L'augmentation de la concentration en  $K^+$  de la solution à KCl 100 mmol.l<sup>-1</sup> provoque un glissement de cette valeur seuil vers une valeur plus positive, proche de celle du nouveau potentiel d'équilibre de  $K^+$  ( $E_K$ ). Cette propriété (déplacement du potentiel d'activation suivant les variations de  $E_K$ ) a également été observée chez le canal SKOR.

Le potentiel d'inversion du courant ( $E_{rev}$ ) est la valeur particulière de potentiel pour laquelle le courant s'annule. Il est obtenu en soumettant l'ovocyte au protocole présenté sur la figure 4.5D. Les courbes obtenues en réponse (figure 4.5E) permettent de déterminer les valeurs de  $E_{rev}$  pour différentes concentrations de  $K^+$  dans la solution extérieure (10 et 100 mmol.l<sup>-1</sup>) de manière graphique, en reportant les valeurs du courant instantané initial (au moment du saut de potentiel) sur une courbe I/V (non montré). Nous avons ainsi constaté que  $E_{rev}$  suit le potentiel d'équilibre de  $K^+$ , ce qui indique que SOR est un canal sélectif du potassium (figure 4.5F).

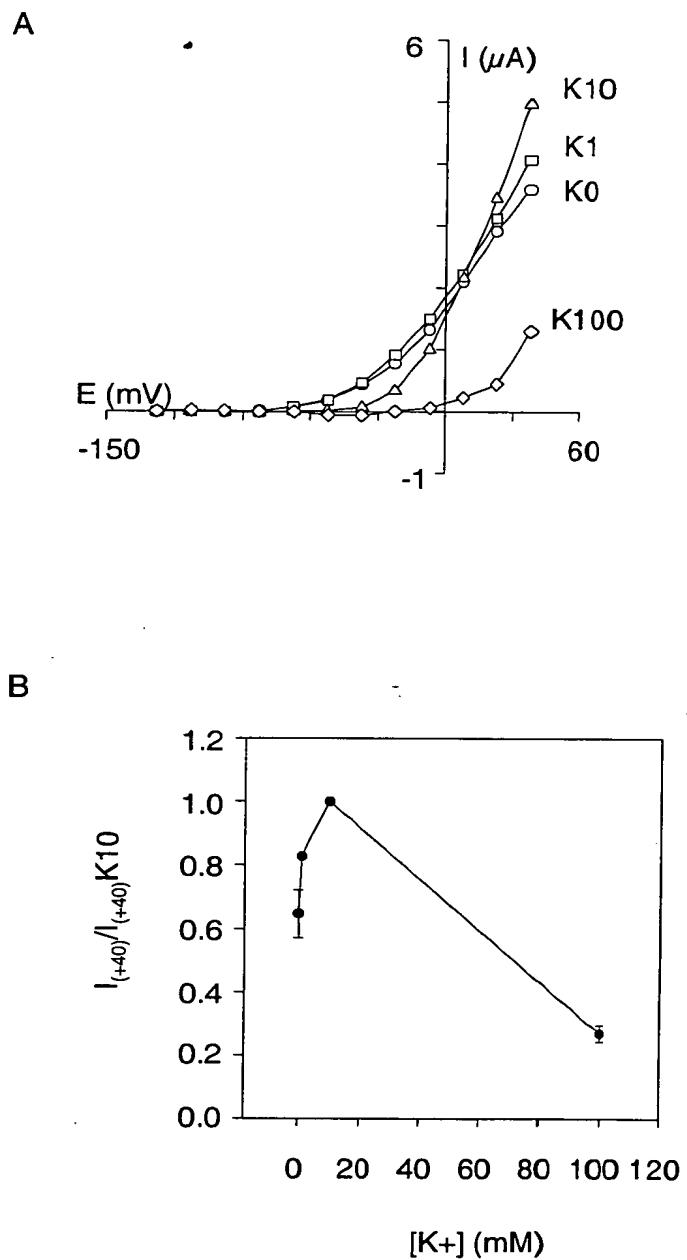


Figure 4.6 : sensibilité de SOR à la concentration externe en  $K^+$ .

Les ovocytes ont reçu une injection de 10 ng de pCI-SOR 4 jours avant les enregistrements (voltage-clamp à deux électrodes). La solution de bain contient: XCl 100 mM ( $[X^+] = [K^+] + [Na^+]$ ), CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, HEPES-NaOH 10 mM (pH 7,4).

A. Courbes courant-voltage pour 4 concentratrices externes en  $K^+$ : 0 (cercles); 1 (carrés), 10 (triangles) et 100 (losanges) mmol.l<sup>-1</sup>.

B. Valeurs du courant stationnaire à +40 mV en fonction de la concentration externe en  $K^+$  normalisée par rapport à la valeur obtenue dans  $K^+$  10 mM (moyennes  $\pm$  ES, n=3).

### **Sélectivité du canal**

La sélectivité peut être évaluée par le rapport du coefficient de perméabilité "P" d'un ion alcalin ( $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ) sur celui de  $\text{K}^+$  (rapport  $P_{\text{RB}}/P_{\text{K}}$  par exemple). Ces rapports sont déterminés à partir du potentiel d'inversion du courant  $E_{\text{rev}}$ , mesuré dans des solutions externes contenant du KCl, puis du RbCl ou du NaCl à la concentration de  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Cela donne une approximation de la capacité des ions qui se trouvent à l'extérieur de la membrane ( $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ) à "compenser" les ions  $\text{K}^+$  à l'intérieur de la cellule. Les valeurs de  $E_{\text{rev}}$  obtenues sont traitées par les équations de Goldman-Hodgkin-Katz, de manière à obtenir les valeurs des rapports des coefficients de perméabilité.

Les rapports de perméabilité  $P_{\text{RB}}/P_{\text{K}}$  et  $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$  obtenus pour SOR sont de  $0,47 (\pm 0,03; n=4)$  et  $0,02 (\pm 0,003; n=5)$  respectivement, indiquant que le canal est très sélectif du  $\text{K}^+$ . Ces valeurs sont proches de celles déterminées pour SKOR (respectivement de  $0,58$  et  $0,04$ ; Gaymard *et al.*, 1998). Il semble que les canaux végétaux de type Shaker sont tous sélectifs du potassium (B. Lacombe, communication personnelle).

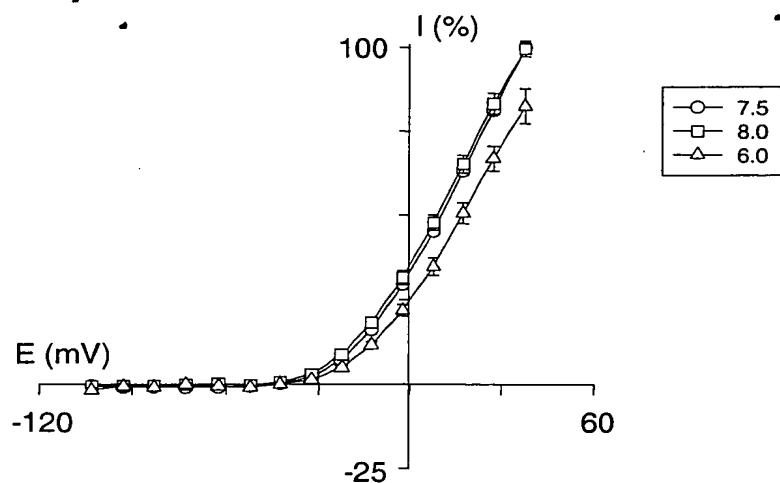
### **Régulation de l'activité du canal par la concentration de $\text{K}^+$ dans la solution extérieure**

L'effet de la concentration externe de  $\text{K}^+$  sur l'activité du canal a été étudié dans la gamme de concentrations de  $0$  à  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$ . D'un point de vue thermodynamique, SOR étant un canal sortant, on pouvait s'attendre à ce que la diminution de la concentration externe de  $\text{K}^+$  provoque une augmentation du courant (augmentation statistique de la tendance du potassium à sortir de la cellule pour établir l'équilibre des concentrations de part et d'autre de la membrane). La figure 4.6 montre que c'est effectivement le cas lorsque la concentration est diminuée de  $100$  à  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Par contre, dans la gamme de  $10$  à  $0 \text{ mmol.l}^{-1}$ , le courant diminue quand la concentration diminue (figure 4.6B). Un phénomène identique a été observé pour SKOR exprimé dans l'ovocyte de xénope (Gaymard *et al.*, 1998), ainsi que pour les canaux sortants caractérisés *in situ* sur la membrane de cellules de garde (Blatt et Gradmann, 1997) ou de cellules du parenchyme xylémien racinaire (Roberts et Tester, 1995; De Boer et Wegner, 1997). Une hypothèse avancée pour expliquer ce type de comportement est qu'il existerait une régulation de l'activité des canaux de type SKOR par les ions  $\text{K}^+$  externes (*i.e.* que le canal présenterait un site de régulation allostérique par  $\text{K}^+$  sur sa face externe).

### **Régulation de l'activité par le pH**

Les effets du pH externe sur l'activité du canal SOR ont été testés pour des valeurs de pH de  $8$ ,  $7,5$  et  $6$ . Le passage de pH  $8$  à pH  $7,5$  n'affecte pas l'intensité du courant de façon significative (figure 4.7A). Par contre, l'acidification à pH  $6,5$  provoque une réduction du courant voisine de  $20\%$  à  $-40 \text{ mV}$  (figure 4.7A). La valeur du potentiel d'activation reste

A

**pHe**

B

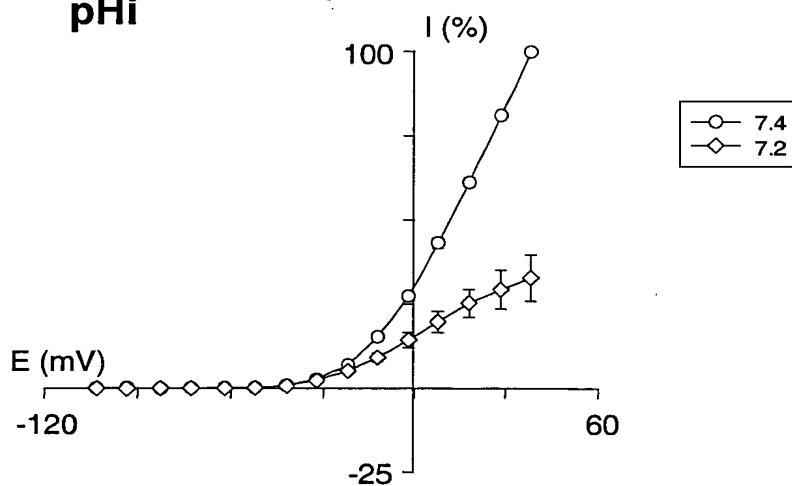
**pHi**

Figure 4.7 : sensibilité de SOR au pH externe et interne.

Les ovocytes ont reçu une injection de 10 ng de pCI-SOR 2 à 7 jours avant les enregistrements (voltage-clamp à deux électrodes). La solution de bain pour l'étude du pH externe (pHe) contient: KCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM et HEPES-NaOH 5 mM (pH 7,4) ou Tris-MES 5 mM (pH 6,0). La solution de bain pour l'étude du pH interne (pHi) contient: CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, HEPES-NaOH 5 mM (pH 7,4) et KCl 100 mM (pHi 7,4) ou K-acétate 100 mM (pHi 7,2). La présence d'acétate (base faible) provoque une acidification du pH cytoplasmique de 0,2 unité environ (Lacombe *et al.*, 2000).

A. Courant à l'état stationnaire en fonction du voltage pour trois valeurs du pH extracellulaire (pHe): 8,0 (carrés); 7,5 (cercles) et 6,0 (triangles).

B. Courant à l'état stationnaire en fonction du voltage pour deux valeurs du pH intracellulaire (pHi): 7,4 (cercles) et 7,2 (losanges).

Les données sont les valeurs moyennes ( $\pm$  ES) de 3-7 ovocytes.

inchangée. Le canal SKOR présente une sensibilité au pH similaire. Il a été montré pour ce canal que cette inhibition est due à une réduction du nombre de canaux ouverts et non à une diminution de la conductance unitaire de chaque canal (Lacombe, 2000).

Les effets du pH interne sont nettement plus marqués. Une acidification de 0,2 unité de pH (de pH 7,4 à pH 7,2) se traduit par une inhibition d'environ 50 % (figure 4.7B). Ici encore, le potentiel d'activation n'est pas modifié. A nouveau, ce comportement est similaire à celui du canal SKOR. Cependant, dans les mêmes conditions, SKOR présente un taux d'inhibition encore supérieur, voisin de 80 %. Cette inhibition, comme celle résultant de l'acidification du pH externe, est également attribuée à une réduction du nombre de canaux ouverts : la conductance unitaire de chaque canal n'est pas altérée par l'acidification, mais le "recrutement" des canaux se fait moins bien.

#### *Propriétés pharmacologiques du canal SOR*

Trois inhibiteurs ont été testés dans cette étude : le Ba<sup>2+</sup>, le TEA (deux bloqueurs classiques des canaux potassiques) et le vérapamil. Ce dernier est principalement connu pour son action bloquante sur les canaux calciques de type L animaux, mais il a également un effet sur certains canaux potassiques sortants végétaux et animaux (Thomine *et al.*, 1994; DeCoursey, 1995).

L'addition de Ba<sup>2+</sup> 5 mM dans la solution externe se traduit par une inhibition du courant voisine de 60 % à -40 mV (figure 4.8A). Au même potentiel, le TEA (10 mM) provoque une réduction du courant proche de 70 % (figure 4.8B), et le vérapamil (10 µM) une inhibition de 45 % (figure 4.8C). L'intensité de l'inhibition par ces trois agents ne dépend pas de la valeur du voltage (résultats non montrés). Les effets inhibiteurs sont comparables à ceux observés pour le canal SKOR.

#### **4.3.2 Analyse en patch-clamp : détermination de la conductance unitaire du canal**

Les expériences de patch-clamp ont été réalisées sur des ovocytes exprimant SOR. Les premières analyses ont été effectuées en configuration "cellule attachée". Cela signifie que la pipette de patch est approchée de la membrane de la cellule, de manière à établir une liaison hydrophobe (verre de la pipette/phospholipides membranaires) très forte. Le courant enregistré dans cette configuration circule par les canaux présents dans le bout de membrane isolé à l'extrémité de la pipette. Ces canaux restent exposés aux conditions cytoplasmiques "normales". Si ces canaux sont peu nombreux, il est possible d'accéder à leurs propriétés "unitaires". La figure 4.9A présente un exemple d'enregistrement de courants unitaires réalisé dans ces conditions, à trois potentiels (0, +30 et +60 mV). L'intensité du courant varie entre un nombre fini de niveaux discrets. Pour une meilleure compréhension, la trace obtenue à

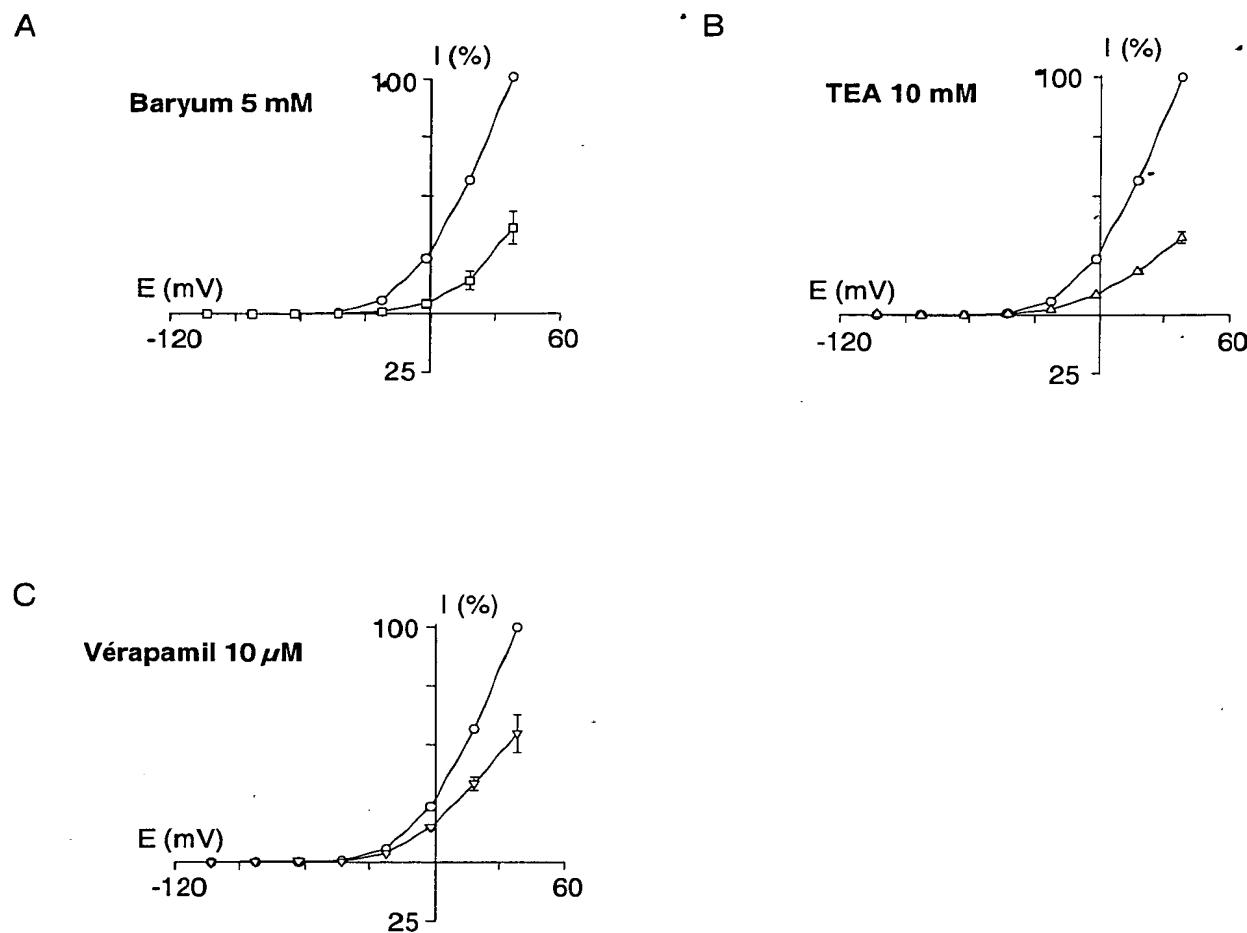


Figure 4.8: caractérisation pharmacologique de SOR : effet bloqueur du baryum, du TEA et du vérapamil.

Les ovocytes ont reçu une injection de 10 ng de pCI-SOR 2 à 7 jours avant les enregistrements (réalisés en voltage-clamp à deux électrodes). La solution de bain contient : KCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, HEPES-NaOH 10 mM, pH 7,4, plus XCl 90 mM ([X]=[Na<sup>+</sup>]+[bloqueur]). Courbes courant/voltage à l'état stationnaire (normalisées par rapport à la valeur de courant à +40 mV en absence de bloqueur) en absence (cercles) ou en présence de Ba<sup>2+</sup> 5 mM (A, carrés), de TEA 10 mM (B, triangles) ou de vérapamil 10  $\mu$ M (C, triangles inversés).

Les données sont les valeurs moyennes ( $\pm$  ES) obtenues pour 3 ovocytes.

0 mV est détaillée ci-après. Les canaux présents dans le patch sont fermés pendant les premières 700 ms. Les fluctuations autour de la ligne de base sont dues à l'agitation thermique : le courant oscille de manière aléatoire autour d'une valeur moyenne. Puis, à 700 ms, le tracé passe à un niveau supérieur : un canal s'est ouvert, et un courant circule à travers. L'amplitude de ce courant est de 1,4 pA environ. Le canal reste ouvert pendant environ 350 ms, puis se referme : le tracé revient au niveau initial, il n'y a plus de courant. Lorsque l'on augmente la valeur de la dépolarisation de la membrane, le nombre de canaux ouverts augmente : 3 niveaux d'ouverture sont détectés à + 30 mV, et un quatrième canal est ouvert à + 60 mV. L'interprétation est que plusieurs canaux (au moins 4) sont présents dans le patch de membrane à l'extrémité de la pipette, et que la probabilité d'ouverture de ces canaux augmente avec la dépolarisation de la membrane. Autrement dit, le canal est régulé par le voltage, la dépolarisation de la membrane l'activant.

La figure 4.9B compare les cinétiques d'activation de ces canaux à celle du courant macroscopique SOR. La courbe correspondant au patch-clamp représente la sommation des enregistrements obtenus pour 150 épisodes de dépolarisation à + 40 mV. Cette courbe présente une allure relativement similaire à la courbe expérimentale obtenue par voltage-clamp à 2 électrodes. Ce type de similitude indique qu'il s'agit bien des mêmes canaux dans les deux cas (*i.e.* courants unitaire et courants macroscopiques).

Les histogrammes d'amplitude présentés sur la figure 4.9C montrent la répartition des canaux entre état fermé et états ouverts, selon le potentiel appliqué. Les données initiales proviennent des enregistrements présentés sur la figure 4.9A. L'enregistrement des courants unitaires est analysé par l'ordinateur comme une succession de points. Ces points peuvent être définis par deux composantes : la composante temporelle ( $n^{\text{ème}}$  point de l'enregistrement), et la composante intensité du courant ( $n$  pA). Les valeurs d'intensité du courant sont alors regroupées en classes d'intervalle défini (par exemple, dans notre cas : 0,005 pA à 0 mV; 0,02 pA à 30 mV et 0,04 pA à 60 mV) par un programme d'analyse. Ce programme représente graphiquement ces classes sous la forme d'un histogramme, indiquant le nombre de points correspondant à une intensité de courant donnée. Les histogrammes sont ajustés par une courbe de Gauss, et l'on obtient les pics présentés sur la figure 4.9C. Comme précédemment, nous allons détailler l'histogramme obtenu pour le courant fixé à 0 mV. Les deux pics sont centrés sur deux valeurs de courant : 0 et 1,4 pA, qui correspondent respectivement à l'état fermé et à l'état ouvert décrits sur la figure 4.9A. La largeur de ces pics n'est pas la même, elle dépend des fluctuations autour de chaque niveau discret, et ces fluctuations sont toujours plus importantes lorsque les canaux sont ouverts, ce qui explique que le pic centré sur 1,4 pA est plus large. La surface d'un pic est proportionnelle au nombre de points ayant été comptabilisés pour l'intensité correspondante, elle est donc le reflet de l'état ouvert ou fermé des canaux du patch. Nous pouvons constater que le pic à 0 pA a une surface plus importante que celui à 1,4 pA : cela correspond bien à l'enregistrement présenté sur la figure 4.9A, où, à 0 mV, les

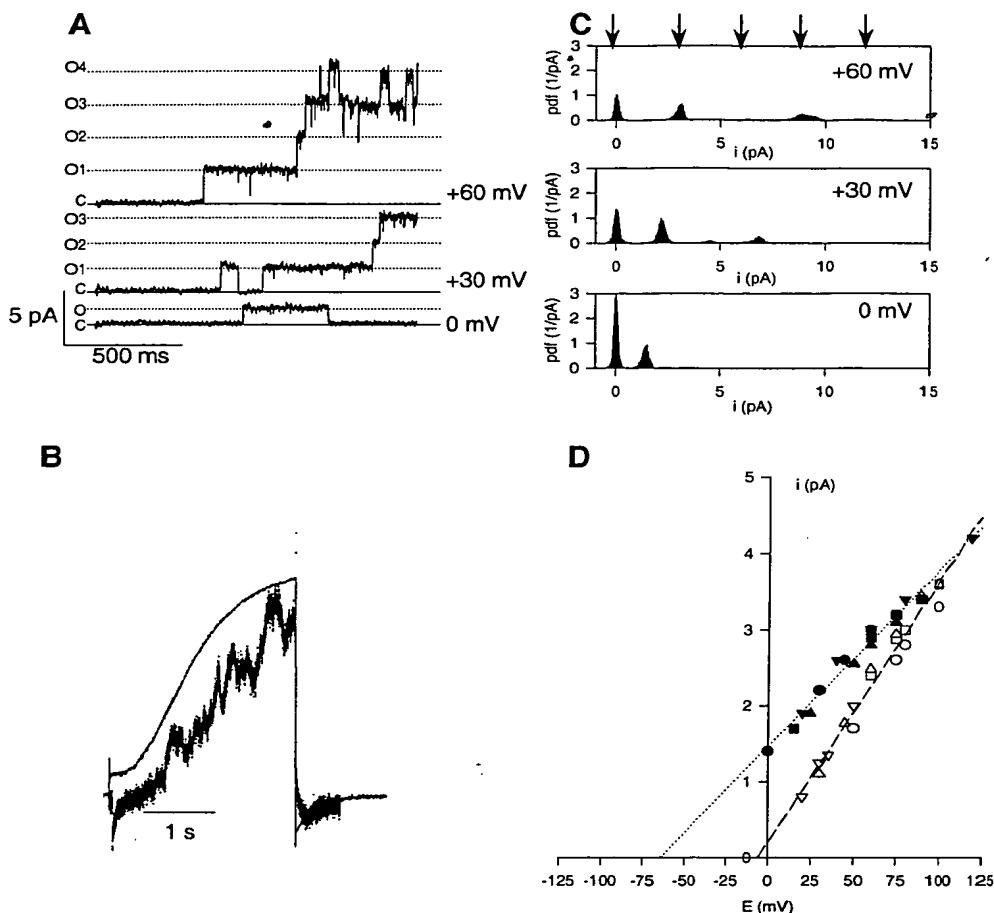


Figure 4.9: caractérisation fonctionnelle de SOR dans l'ovocyte de xénope par la méthode du patch-clamp.

Les ovocytes ont reçu une injection de 10 ng de pCI-SOR 2 à 7 jours avant les enregistrements (mode cellule attachée). La solution de bain contient : KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, HEPES-NaOH 10 mM (pH 7,4). La solution de pipette contient : XCl 100 mM ( $[X^+] = [K^+] + [Na^+]$ ), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, HEPES-NaOH 10 mM (pH 7,4).

**A.** Courants unitaires enregistrés en réponse à une dépolarisation de la membrane (0, 30 et 60 mV). Quatre canaux au moins sont présents dans ce patch. C : canal fermé; O1, O2, O3 et O4 : un, deux, trois ou quatre canaux ouverts, respectivement.

**B.** Comparaison des cinétiques d'activation de SOR obtenues en voltage-clamp à deux électrodes et en patch-clamp. La trace supérieure est le courant macroscopique normalisé enregistré à +40 mV en voltage-clamp à deux électrodes. La courbe inférieure représente la sommation de 150 épisodes (de 2,5 s chacun) à +40 mV en patch-clamp (mode cellule attachée) similaires à ceux présentés dans le panneau A.

**C.** Histogrammes d'amplitude obtenus à partir des enregistrements présentés en (A). Le pic, à environ 0 pA, correspond à l'état fermé et les autres pics à 1, 2, 3 ou 4 canaux ouverts. Les flèches indiquent les positions des pics obtenus à +60 mV.

**D.** Courants unitaires représentés en fonction du potentiel imposé. Les amplitudes de courants sont obtenues à l'aide des histogrammes d'amplitude (comme ceux présentés en C). Les symboles pleins représentent les courants enregistrés avec 10 mmol.l<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup> dans la pipette, alors que les symboles ouverts représentent les courants enregistrés avec 100 mmol.l<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup>. Chaque symbole correspond à un patch différent (n=4). Les courbes en pointillés correspondent aux ajustements linéaires, déterminant la conductance unitaire : 23 pS pour 10 mmol.l<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup> et 34 pS pour 100 mmol.l<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup>.

canaux sont plus souvent à l'état fermé qu'à l'état ouvert. Lorsque le potentiel de dépolarisation augmente, les canaux s'ouvrent. Chaque pic est centré sur la valeur du courant correspondant à l'ouverture de 1, 2, 3 ou 4 canaux (O1, O2, O3, O4) (voir les flèches sur la figure 4.9C). La distance séparant les pics est identique pour une valeur de voltage donnée : elle correspond au courant unitaire du canal, et puisqu'elle est constante entre deux pics, cela montre que l'on a bien des canaux identiques (*i.e.* SOR) dans le patch.

A partir des données présentées dans les figures 4.9A et C, il est possible de tracer la courbe I/V des courants unitaires en fonction du potentiel (figure 4.9D). Un ajustement linéaire des valeurs pour chaque concentration de potassium externe permet de déterminer la conductance unitaire du canal dans ces conditions : 23 pS dans K<sup>+</sup> 10 mM et 34 pS dans K<sup>+</sup> 100 mM. La valeur de 23 pS dans K<sup>+</sup> 10 mM est comparable à celle du canal SKOR dans les mêmes conditions. On observe de plus que la valeur de potentiel à laquelle chaque droite de régression coupe l'axe des abscisses correspond approximativement à la valeur de E<sub>K</sub> (fonction de la concentration en potassium du milieu) : respectivement -60 mV dans K<sup>+</sup> 10 mM et 0 mV dans K<sup>+</sup> 100 mM. Cela indique que le courant est essentiellement porté par les ions K<sup>+</sup>, confirmant donc que le canal est effectivement sélectif de cet ion.

## 4.4 Localisation de l'expression du gène *SOR* dans la plante

Les données d'expression du gène *SOR* dans la plante (cv Pinot noir) ont été obtenues par RT-PCR. Cette étude a nécessité l'adaptation préalable des protocoles connus d'extraction d'ARN aux différents organes étudiés.

### 4.4.1 Extraction d'ARN

L'isolement d'ARN totaux intègres est un problème pour un grand nombre d'espèces et organes végétaux (notamment les fruits). Les difficultés rencontrées sont souvent liées aux accumulations de réserves lipidiques ou glucidiques et de produits du métabolisme secondaire. Chez la vigne, elles sont dues à la présence massive de polyphénols et polysaccharides, qui contaminent les préparations d'ARN. Les polyphénols peuvent provoquer des phénomènes d'oxydation, dès les premières étapes de la purification, ce qui se traduit ensuite par une altération de la qualité des ARN. Les polysaccharides, eux, n'altèrent pas la qualité des ARN mais affectent le rendement de l'extraction et les réactions de biologie moléculaire ultérieures. En effet, ils sont difficilement séparables des ARN pendant les étapes de purification (notamment pendant la précipitation alcoolique, Cf. chapitre 2, § 2.3.1). Leur présence dans la solution d'ARN augmente la viscosité de cette solution, rendant le pipettage très imprécis et faussant la migration électrophorétique. De plus, les polysaccharides, de

même que les polyphénols, compliquent les dosages spectrophotométriques car ces composés ont une absorbance sous UV identique ou proche de celle des ARN. Enfin, ces composés peuvent créer des liaisons irréversibles avec les ARN, ce qui perturbe leur migration électrophorétique et inhibe l'action des enzymes classiques de biologie moléculaire.

L'extraction des ARN de vigne a nécessité l'utilisation de trois protocoles. Les ARN des parties végétatives aériennes ont été extraits par la méthode décrite par Fillion *et al.* (1999). L'extraction des ARN de baies a été réalisée selon le protocole mis au point par Tesnière et Vayda (1991) et simplifié par Fillion *et al.* (1999). Ces deux protocoles, et un troisième, décrit par Parcy (Parcy *et al.*, 1997; Parcy et Giraudat, 1997), ont été utilisés pour extraire des ARN des racines, mais aucun d'entre eux ne nous a permis d'obtenir de préparation satisfaisante d'ARN à partir des ces organes.

#### ***Extraction d'ARN d'organes végétatifs aériens***

Le protocole permettant d'extraire les ARN des parties végétatives aériennes avec le meilleur rendement est le protocole décrit par Fillion *et al.* (1999), adapté de celui mentionné par Davies et Robinson (1996) (*Cf.* chapitre 2, § 2.3.1). Il est basé sur l'extraction au perchlorate de sodium (5 M), un puissant agent chaotropique. Ce composé est supposé déstabiliser toutes les structures des composants cellulaires. Il est utilisé en association avec du PEG 4000 (2 % w/v), du SDS (1 % w/v), du  $\beta$ -mercaptopropanol (1 % w/v), qui renforcent son effet déstabilisant, et avec de la polyvinyl-polypyrrrolidone, qui chélate les polyphénols.

La pureté des ARN, évaluée sur gel d'électrophorèse dénaturant, est très satisfaisante. Les ARN ribosomiques, mais aussi les ARNt semblent parfaitement intacts. Le rendement de la purification est de 20  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux par g de matière fraîche pour les rafles, de 110  $\mu\text{g}$  par g pour les feuilles et de 30  $\mu\text{g}$  par g pour les tiges.

#### ***Extraction des ARN de baies***

Les ARN de baies ont été extraits suivant le protocole décrit par Fillion *et al.* (1999), adapté de celui mis au point par Tesnière et Vayda (1991). Ce protocole repose sur une purification des ARN par ultracentrifugation de l'homogénat cellulaire à travers un coussin de chlorure de césium 5,7 M. Le tampon d'extraction employé ne contient pas d'agent organique déprotéinisant, mais des détergents, combinés à un inhibiteur non-spécifique de protéases (l'acide aurintricarboxylique), une force ionique importante et un pH basique.

Le rendement des extractions est relativement constant au long du développement de la baie : 11  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux par g matière fraîche en moyenne pour les jeunes baies, 15  $\mu\text{g}$  par g à la véraison et 10  $\mu\text{g}$  par g pour les baies matures.

### **Extraction d'ARN de racines**

Le protocole décrit précédemment pour les parties aériennes a également été utilisé pour tenter d'extraire des ARN de racines provenant de plantes cultivées sur un substrat de perlite. Des ARN ont été obtenus avec un rendement apparent de 25 µg par g de matière fraîche. Cependant, la suspension d'ARN était très visqueuse, les ARN présentaient un retard certain en migration électrophorétique, et leur aspect suggérait une altération de leur qualité. De fait, les réactions de RT-PCR ont toujours échoué sur ces ARN, de même que les tentatives d'hybridation en Northern blot. Il est donc fort probable que des éléments contaminants étaient restés avec les ARN malgré la purification, et empêchaient toute utilisation de ce matériel.

Nous avons donc testé un protocole classique employé pour les extractions d'ARN d'*Arabidopsis* et de Maïs, maîtrisé au laboratoire. Les racines utilisées alors provenaient de vignes cultivées en hydroponie. Le protocole utilise un mélange phénol/chloroforme/isoamylalcool particulier (50/24/1 v/v/v) (Parcy *et al.*, 1997; Parcy et Giraudat, 1997) qui permet de ne garder que les acides nucléiques dans la phase aqueuse. Une précipitation différentielle par du LiCl est effectuée pour ne garder que les ARN. Les ARN ont été obtenus avec un meilleur rendement qu'avec la méthode précédente (80 µg par g de matière fraîche), et la suspension était moins visqueuse. Cependant, elle présentait une couleur brune indiquant que des contaminants étaient encore présents dans les extraits. Les résultats de l'analyse par électrophorèse suggéraient toutefois que les ARN étaient de bonne qualité. Les réactions de RT-PCR et les hybridations ont quand même échoué.

Le protocole utilisé pour l'extraction des ARN de baies (présentée ci-dessus) a également été tenté pour obtenir des ARN de racines purs. Cependant, malgré de multiples tentatives, les ARN étaient toujours dégradés à l'issue de la purification.

#### **4.4.2 Localisation de l'expression par Northern Blot**

La méthode de Northern blot est couramment utilisée pour déterminer la localisation de l'expression d'un gène. Nous avons tenté d'utiliser cette méthode avec les ARN extraits selon les méthodes décrites précédemment. Dix µg d'ARN ont été déposés sur un gel d'électrophorèse dénaturant, transférés sur membrane, et hybridés avec une sonde correspondant à l'ADNc *SOR*. Aucun signal n'a pu être détecté, quelle que soit la température ou le tampon d'hybridation employés. Nous avons également testé une sonde correspondant à un gène ubiquitaire, exprimé constitutivement, codant le facteur d'elongation de la traduction *EF1γ* (Kidou *et al.*, 1998). Seuls les ARN de feuilles, tiges et jeunes rafles, extraits par la

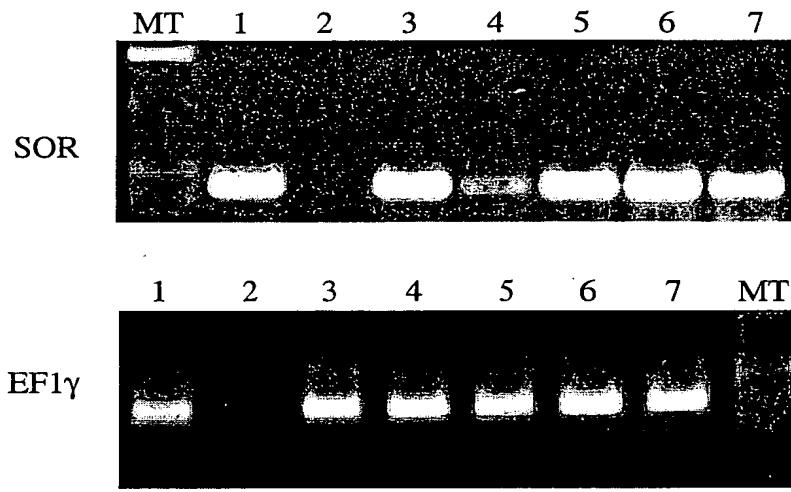


Figure 4.10 : localisation de l'expression de *SOR* par RT-PCR.

Dix µg d'ARN totaux ont été rétro-transcrits, et 1 µl de la réaction a servi de matrice pour la PCR. 1: rafles (avant la véraison); 2 : racines; 3 : tiges; 4 : jeunes feuilles; 5: jeunes baies (récoltées 30 j avant véraison); 6 : baies à véraison; 7 : baies en cours de maturation (densité des baies de 150-180 g.l<sup>-1</sup>). Le gel du haut correspond à l'analyse des produits de PCR obtenus avec des amorces spécifiques de *SOR*. Les produits d'amplification présentés sur le gel du bas ont été obtenus avec des amorces spécifiques de *EF1γ*. La RT-PCR d'*EF1γ* constitue le témoin positif de réaction.

méthode de Fillion *et al.* (1999), ont permis d'obtenir un signal, de très faible intensité. Ces résultats suggèrent que :

- le gène *SOR* est trop faiblement exprimé pour être détectable en Northern blot, et/ou
- il reste des contaminants avec les ARN, qui gênent l'hybridation.

Nous nous sommes donc tournés vers la technique de RT-PCR pour localiser l'expression du gène *SOR* dans la plante.

#### 4.4.3 Localisation de l'expression par RT-PCR

La présence du transcrit *SOR* a été recherchée dans les organes suivants : feuilles, racines, tiges, jeunes rafles et baies. Nous avons recherché son expression dans la baie à trois stades de développement différents : jeune baie verte, baie à véraison et baie en cours de maturation.

Les réactions de transcription inverse ont été réalisées à partir de 10 µg d'ARN totaux, extraits selon les différentes méthodes décrites au paragraphe 4.4.1. Une partie aliquote du produit sert de matrice pour la réaction de PCR. Celle-ci est réalisée dans des conditions non quantitatives, l'objectif étant ici d'obtenir seulement une réponse de type "présence ou absence" de l'ARN messager *SOR*. Les réactions ont été répétées trois fois de manière indépendante, à partir de lots d'ARN différents. Nous avons choisi comme témoin positif de réaction le facteur d'elongation *EF1γ*. Un fragment de sa séquence codante (315 pb) est disponible dans les banques de données. Il a été obtenu chez le cv Kyoho, issu du croisement *Vitis labrusca* x *Vitis vinifera* (AC 176496). Les amorces dessinées à partir de cette séquence ont donné de bons résultats d'amplification chez *V. vinifera*, sur ADN génomique comme sur ADNc.

Les résultats des RT-PCR sont présentés sur la figure 4.10. L'ARN *SOR* a été rétro-transcrit et amplifié dans tous les échantillons à l'exception des racines. Cela ne signifie pas que *SOR* n'y est pas exprimé, puisqu'il n'y a pas non plus amplification d'*EF1γ*. La réaction a été répétée à plusieurs reprises sans obtenir d'amplification pour aucun des deux gènes, accentuant le doute sur la qualité de l'extrait d'ARN.

Les différences d'intensité observées sur gel entre les différents dépôts après analyse électrophorétique ne peuvent pas être considérées comme significatives. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, l'efficacité de réaction des transcriptions inverses et surtout des PCR peut varier dans de très larges proportions, d'autant plus que nous n'avons pas pris en compte, dans cette expérience, les limites quantitatives de la PCR. Nous pouvons seulement conclure de ces résultats que le gène *SOR* est exprimé dans tous les organes aériens testés (feuilles, tiges, rafles) et dans les baies quel que soit leur stade de développement.

## 4.5 Quantification de l'abondance des transcrits SOR

Une analyse de l'expression par RT-PCR quantitative a été menée sur les organes où l'expression de *SOR* a été détectée : feuilles, tiges, jeunes rafles, et baies. L'étude sur les baies a été conduite de façon plus détaillée que précédemment, en utilisant 9 lots différents de baies correspondant à des stades de développement de plus en plus avancés (tableau 4.2).

### 4.5.1 Méthodes

#### *Réalisation et analyse des RT-PCR quantitatives*

Le principe expérimental est semblable à celui d'une RT-PCR classique. Cependant, afin de niveler les différences d'efficacité de réaction, nous avons dans un premier temps mélangé les produits de 3 réactions de transcription inverse. Ce mélange a servi de matrice à 3 PCR pour chaque gène étudié (*SOR* et *EF1 $\gamma$* ).

Une réaction de PCR présente trois phases. La première comporte un temps de latence plus ou moins long avant que l'on commence à détecter une amplification. La seconde est une période d'amplification exponentielle (*i.e.* on obtient une droite si on représente l'apparition de l'ADN en fonction du temps en échelle semi-logarithmique). Enfin, la troisième phase correspond à l'établissement d'un plateau : l'amplification se fait avec une efficacité réduite car le milieu réactionnel est épuisé. Afin de travailler dans des conditions quantitatives, il faut déterminer les bornes de la deuxième phase. Pour cela, nous avons effectué des prélèvements de mélange réactionnel entre le dixième et le vingt-quatrième cycle, tous les deux cycles. Ces prélèvements ont été dénaturés à la soude, déposés sur membrane, et hybridés avec les sondes correspondant à *SOR* et *EF1 $\gamma$* . Les résultats de ces hybridations ont été analysés par utilisation d'un phosphorimager et du logiciel ImageQuant. Les analyses statistiques opérées sur les données de quantification nous ont permis de déterminer la zone d'amplification la plus linéaire en représentation semi-logarithmique : elle se situe entre le 14<sup>ème</sup> et le 22<sup>ème</sup> cycle.

Nous avons alors estimé, dans cet intervalle, la quantité de transcrits *SOR* par rapport au témoin interne *EF1 $\gamma$* . Cela a été fait par 2 méthodes différentes.

- (i) Nous avons calculé pour chaque gène, les moyennes des valeurs de quantification obtenues pour les 3 PCR, pour chaque cycle de la zone linéaire où il y a eu prélèvement (c'est-à-dire les cycles 14, 16, 18, 20 et 22). Nous avons alors fait le rapport de ces valeurs moyennes (*i.e.* moyenne obtenue pour *SOR*/moyenne obtenue pour *EF1 $\gamma$* ) pour chacun de ces cycles. Enfin, nous avons calculé la moyenne générale de ces rapports (en ne faisant plus de distinction entre les cycles). On obtient ainsi la valeur moyenne de la quantité d'ADNc *SOR* par rapport à *EF1 $\gamma$* , pour la zone linéaire de la PCR. Ce résultat est pris comme indicateur de l'abondance du messager *SOR* par rapport à celle du messager *EF1 $\gamma$*  dans l'échantillon soumis à la transcription inverse.

Lot	Stade de développement
1	30 jours avant véraison
2	8 jours avant véraison
3	véraison
4	10-20% des baies colorées
5	30-50% des baies colorées
6	Densité de 150-180 g.l <sup>-1</sup> (équivalent saccharose)
7	100% des baies colorées
8	Densité de 180-220 g.l <sup>-1</sup> (équivalent saccharose)
9	Densité de 220-250 g.l <sup>-1</sup> (équivalent saccharose)

Tableau 4.2 : stades de développement des baies utilisées pour l'analyse de l'expression du gène *SOR* (et du gène *SIRK* : Cf. chapitre 5, § 5.4.2, figure 5.13).

La véraison a été déterminée au moment où environ 50% des baies de la parcelle étudiée avaient subi un ramollissement. Le pourcentage de coloration des baies est estimé sur une grappe. La densité est exprimée en g.l<sup>-1</sup> de saccharose. Les baies sont plongées dans des solutions de concentrations croissantes de saccharose (150, 180, 220, 250 g.l<sup>-1</sup>). Lorsqu'elles flottent, elles sont moins denses que la solution testée. Quand elles coulent, elles sont de densité supérieure. Les deux valeurs spécifiées indiquent respectivement la concentration de saccharose à laquelle les baies coulent et celle à laquelle elles flottent.

- (ii) Pour les mêmes cycles que ci-dessus (14, 16, 18, 20 et 22) de chaque PCR, le rapport des signaux relatifs à *SOR* et *EF1 $\gamma$*  est calculé. Puis la moyenne des 3 rapports obtenus pour chacune des 3 PCR est établie. La moyenne de ces moyennes (tous cycles confondus), constitue également un indicateur de l'abondance de *SOR* par rapport à *EF1 $\gamma$* .

En pratique, les deux méthodes nous ont donné des résultats très proches. Les résultats présentés dans la suite correspondent à ceux obtenus par la seconde méthode.

#### *Ordonnancement des échantillons de baies*

L'expression du gène *SOR* a été analysée au cours du développement de la baie. Les baies ont été récoltées toujours à la même heure de la journée, et selon des critères différents au cours de leur développement. Au stade herbacé, elles ont été classées selon leur taille, en fonction de la date. La véraison a été déterminée par le ramollissement des baies (véraison physiologique). Ce stade a été apprécié au toucher. Après la véraison, les baies ont été classées en fonction du pourcentage de coloration des baies au sein d'une grappe. L'évolution de la couleur est un bon marqueur des premières phases de la maturation des baies. Les baies provenant de trois grappes de premier rang ont été récoltées, à partir de trois céps différents. Les baies dont la taille diffère clairement de celle des autres baies de l'échantillonnage ont été éliminées. Cependant, la maturation se poursuit bien après que les baies d'une même grappe soient toutes complètement colorées. La méthode utilisée alors pour évaluer l'état de maturation a consisté à estimer la densité des baies par rapport à des solutions de saccharose de concentrations définies (de 150 à 250 g.l<sup>-1</sup>). Les baies sont plongées dans les différentes solutions. Si elles flottent, leur densité est inférieure à celle de la solution, et elle est supérieure si elles coulent. Cela permet de déterminer deux valeurs de densité qui encadrent la densité effective de la baie. Cependant, d'un point de vue pratique, l'évolution de la densité des baies commence avant que la coloration d'une grappe ne soit homogène. Nous avons pu constater que, dans nos conditions, la densité 150-180 g.l<sup>-1</sup> correspond à environ 75 % de baies colorées dans une grappe, et que 100 % de baies colorées correspondent à une densité qui dépasse toujours 180 g.l<sup>-1</sup>. Les échantillons ont été ordonnés selon ces observations (tableau 4.2).

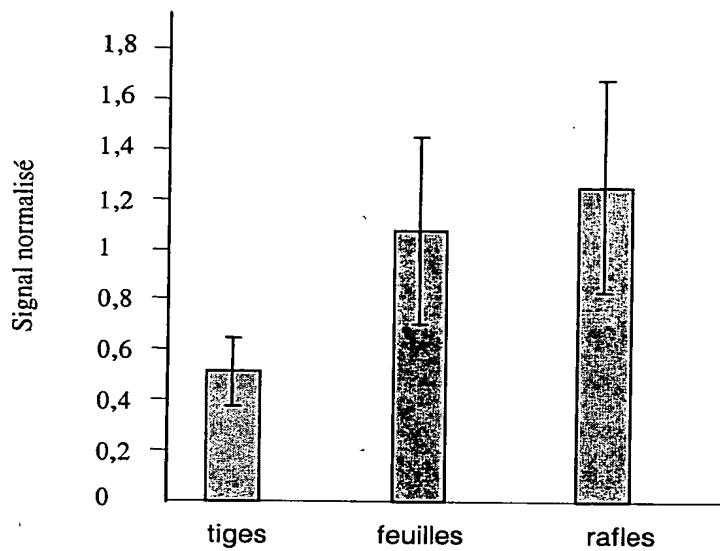


Figure 4.11 : quantification de l'expression de *SOR* dans les organes végétatifs par RT-PCR quantitative.

Dix µg d'ARN totaux ont été rétro-transcrits. Un µl de la réaction a servi de matrice pour la réaction de PCR réalisée dans des conditions quantitatives (*Cf. texte, § 4.5.1*). La quantification se fait par rapport au standard interne : le facteur d'elongation EF1<sub>γ</sub>.

## 4.5.2 Quantification de l'expression

### *Organes végétatifs aériens*

La figure 4.11 permet de comparer les quantités d'ADNc amplifiées pour les feuilles, les tiges et les jeunes rafles. La plus faible représentation de *SOR* est observée pour les tiges. Son abondance relative semble environ deux fois plus importante dans les feuilles et les rafles.

### *Baies à différents stades de développement*

Neuf stades de développement ont été analysés (tableau 4.2). L'ARN *SOR* est présent à chacun de ces stades, puisque la réaction de RT-PCR se traduit par une amplification dans chaque cas (figure 4.12). La tendance qui se dégage de cette figure est une légère décroissance de l'abondance relative du transcrit au fur et à mesure de la maturation de la baie.

## 4.6 Discussion

### 4.6.1 Analyse des séquences

#### *Séquences protéiques*

L'alignement des séquences protéiques des canaux SOR, SKOR et SKOR2 révèle une forte conservation de la séquence primaire, et probablement de la structure, de ces polypeptides. Les trois séquences partagent environ 70 % de résidus identiques sur les six domaines structuraux. Parmi ces domaines, les plus conservés sont le domaine transmembranaire, le domaine de jonction, et le domaine de fixation des nucléotides cycliques (environ 90 à 95 % de résidus similaires). Ces trois domaines possèdent strictement la même longueur. La majorité des divergences observées dans ces domaines entre les 3 canaux ne sont pas des substitutions synonymes, mais des remplacements par des acides aminés de charges ou de taille très différentes, ce qui suggère que ces changements observés résultent d'une dérive génétique plutôt que d'une pression de sélection. De plus, il est intéressant de remarquer que les positions où les acides aminés des 3 séquences sont différents sont rares : 15 positions seulement sur les 420 résidus couvrant les 3 domaines. En général, deux canaux sur les 3 partagent un résidu commun. Cela conforte l'idée que les changements survenus à ces 15 positions ont résulté de mutations au hasard plutôt que d'une pression adaptative, et qu'il existe au contraire une pression sélective relativement forte sur la majeure partie des résidus.

Les zones les plus divergentes sont le domaine N-terminal, le domaine ankyrine et le domaine K<sub>HA</sub>. Cette divergence ne concerne cependant que 25 à 30 % des résidus. Les changements observés dans les séquences des trois domaines ankyrine pourraient traduire les

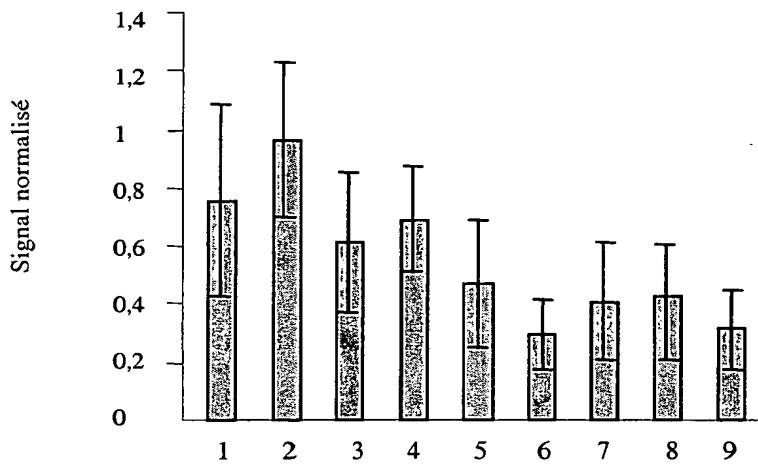


Figure 4.12 : quantification par RT-PCR quantitative de l'expression de *SOR* dans les baies au cours du développement.

Protocole expérimental: Cf. texte, § 4.5.1. Les stades de développement en abscisse sont indiqués ci-dessous et dans le tableau 4.2. 1 : 30 j. avant véraison. 2 : 8 j avant véraison. 3 : véraison. 4 : 10-20 % des baies colorées. 5 : 30-50 % des baies colorées. 6 : baies de densité de 150 à 180 g.l<sup>-1</sup>. 7 : 100 % des baies colorées. 8 : baies de densité 180 à 220 g.l<sup>-1</sup>. 9 : baies de densité de 220 à 250 g.l<sup>-1</sup>.

nécessités d'interaction avec des protéines diverses. En effet, le motif ankyrine est très souvent associé à des interactions protéine-protéine, impliquant notamment des protéines du cytosquelette et des protéines de régulation.

Les domaines N- et C-terminaux présentent non-seulement des différences marquées de séquence, mais aussi de taille. Cela est particulièrement net pour le domaine N-terminal. Celui-ci peut être subdivisé en deux parties. La partie proche du domaine transmembranaire est relativement conservée entre les trois canaux, alors que la partie distale s'organise de manière indépendante. Il est donc probable que la partie proximale ait été conservée à partir de la structure ancestrale. Les résidus qui la composent sont sans doute nécessaires à la stabilisation des interactions avec la membrane à proximité du premier segment transmembranaire (présence de résidus aromatiques et chargés). En revanche, les parties distales semblent avoir évolué de manière indépendante entre *Arabidopsis* et *Vitis*, et même à l'intérieur de la famille Shaker chez *Arabidopsis*.

Le fort taux de conservation observé pour les canaux entre *Vitis* et d'autres espèces correspond en fait à un phénomène plus général. En effet, au cours des dernières années, les clonages de diverses enzymes telles que l'arginine décarboxylase, (Primikirios et Roubelakis-Angelakis, 1999), la  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthétase (Stines *et al.*, 1999), la glutamine synthase (Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1996), ou le transporteur d'hexoses VvHT1 (Fillion *et al.*, 1999), ont mis en évidence que les séquences de vigne présentent en général de 60 à 90 % de résidus (acides aminés et nucléotides) identiques avec les espèces références. Il semble donc que la spéciation de *Vitis* ait eu lieu relativement tard après la fixation de la séquence fonctionnelle de nombreux gènes (*Cf.* § 1.5.2).

### ***Structure des gènes***

L'étude de la position des introns révèle également une forte conservation au niveau de la structure des gènes entre *Vitis* et *Arabidopsis*. En effet, pour les introns que nous avons réussi à identifier, les positions d'insertion sont conservées. *SOR* semble posséder la même structure génique que *SKOR2*, avec un intron caractéristique de ce gène (intron 8) et l'absence de l'intron caractéristique de *SKOR* (intron 6). Cependant, comme *SKOR*, *SOR* possède le premier intron, situé dans le domaine N-terminal. Le positionnement des introns restant permettra de déterminer si *SOR* est bien l'orthologue de *SKOR2* ou s'il s'agit d'un intermédiaire évolutif entre *SKOR* et *SKOR2*, ayant une structure génique propre. L'étude des comportements évolutifs des familles multigéniques étudiées chez *Arabidopsis* a mis en évidence deux possibilités d'évolution. Chez certaines familles, la structure des gènes est strictement conservée entre les différents membres (McDowell *et al.*, 1996; Dornelas *et al.*, 1998), ce qui indique que les gènes ont divergé de l'ancêtre commun tout en conservant sa structure. Par contre, il existe des familles dans lesquelles la structure des gènes actuels est

très différente d'un gène à l'autre. Cela suggère que l'ancêtre ne possédait pas d'introns, ou que les introns ancestraux ont été perdus ou se sont déplacés dans la séquence des gènes (Aubourg *et al.*, 1999). L'analyse des gènes de la famille des canaux de type Shaker d'*Arabidopsis* a révélé une situation intermédiaire : la position des introns et les séquences protéiques ont évolué de manière parallèle et peu divergente (Pilot, 1999). L'analyse des structures géniques des canaux potassiques végétaux connues à l'heure actuelle suggère que la conservation de la structure génique a dépassé le cadre de l'espèce *Arabidopsis*. En effet, pour les deux canaux de vigne clonés dans cette étude, les positions d'introns sont strictement conservées, et chez le maïs, la majeure partie des introns du gène *ZmSKOR* est également conservée, à l'exception de certains décalages de quelques paires de bases (C. Alcon, communication personnelle), qui pourraient être interprétés comme des "glissements" d'introns (Stolzfus *et al.*, 1997). Enfin, le gène *OzKAT1*, issu du séquençage systématique du génome du riz, possède le même nombre et les mêmes positions d'introns que son orthologue *KAT1*. Les caractéristiques de la famille Shaker d'*Arabidopsis* se retrouvent ainsi chez ces autres espèces.

Les introns de *SOR* sont particulièrement longs. Chez *Arabidopsis*, la longueur des introns des gènes de canaux potassiques de type Shaker est comprise entre 66 et 1065 pb, avec seulement 6 introns dépassant les 200 pb (Pilot, 1999). Les 6 introns clonés de *SOR* ont tous une taille supérieure à 200 pb, et 3 comptent plus de 800 pb. Ces longueurs sont très rares chez les végétaux (Hawkins, 1988). Le second gène de vigne codant un canal potassique, cloné au cours de cette étude (*Cf. chapitre 5*), présente des introns de taille globalement supérieure à la taille des introns des canaux d'*Arabidopsis*, mais plus en accord avec les observations de Hawkins (1988). Il existe très peu d'informations sur les longueurs d'introns des gènes codant des canaux Shaker chez les végétaux autres qu'*Arabidopsis*, la majorité d'entre eux n'étant pas séquencée. Il est donc difficile d'émettre des hypothèses expliquant la longueur des introns de *SOR*.

#### 4.6.2 Analyse fonctionnelle du canal SOR

Nous avons vu au paragraphe précédent que *SOR* présente une forte conservation de la structure génique et de la séquence protéique avec les canaux de type SKOR d'*Arabidopsis*. La caractérisation électrophysiologique de *SOR* a de plus mis en évidence une conservation du "comportement fonctionnel" de ce canal par rapport aux deux autres canaux. Comme SKOR et SKOR2, *SOR* est un canal à rectification sortante : il est ouvert à des potentiels de membrane tels que le potassium ne peut que sortir de la cellule vers le milieu extérieur. Ce canal s'active lentement, de manière sigmoïdale, et ne s'inactive pas, ce qui signifie qu'il peut conduire des flux soutenus de potassium à l'extérieur de la cellule.

Les autres caractéristiques que SOR partage avec les canaux de type SKOR sont la forte sélectivité vis-à-vis du potassium et le profil pharmacologique (sensibilité au  $\text{Ba}^{2+}$ , TEA, vérapamil). On considère généralement que la caractérisation pharmacologique d'un canal doit être réalisée de manière préliminaire à son analyse *in situ* dans l'organisme d'origine, de manière à faciliter son identification. Cependant, il ressort des comparaisons des divers canaux potassiques végétaux testés que tous présentent des sensibilités voisines aux agents bloquants (B. Lacombe, communication personnelle). Une telle similitude des caractéristiques électrophysiologiques peut constituer un handicap pour les explorations *in planta*.

D'autre part, les variations de pH externe ne provoquent pas de modifications majeures du fonctionnement des canaux SKOR et SOR. En revanche, une légère acidification interne (0,2 unité de pH) se traduit chez SKOR par une inhibition de 80 % de son activité. SOR est moins sensible au pH interne, il n'est inhibé qu'à 50 % par la même variation. La sensibilité de SKOR2 au pH n'a pas encore été analysée. Il n'est pas certain que la différence quantitative observée entre SKOR et SOR ait une signification physiologique particulière, d'autant plus que ces deux canaux ne sont pas exprimés dans les mêmes types tissulaires (*Cf.* § 4.6.3). Cependant, il est important de noter que la variation de 0,2 unité de pH interne que nous avons introduite dans nos expériences pourrait permettre de dévoiler des mécanismes de régulation de l'activité du canal ayant une signification physiologique. Il existe par exemple des observations indiquant que les flux d'ions  $\text{H}^+$  et le pH cytoplasmique pourraient jouer un rôle dans la signalisation cellulaire (Ebel et Mithöfer, 1998; Felle *et al.*, 1998; Grabov et Blatt, 1998). D'autre part, une acidification du cytoplasme pourrait se produire dans la baie, en relation avec l'accumulation d'acides organiques (acide malique et acide tartique) qui a lieu au cours de la maturation. On peut ainsi imaginer que la plus faible sensibilité de SOR à l'acidification interne traduise une adaptation à la physiologie particulière de la baie de raisin. Il est possible, par exemple, que l'apport d'acides organiques dans la cellule se traduise par une légère acidification du micro-environnement membranaire, qui diminuerait l'efflux des ions  $\text{K}^+$  par les canaux SOR, conduisant à une conservation de charges positives dans la cellule, neutralisant les charges négatives des organates. Il est également possible d'attribuer la différence de comportement de SKOR et de SOR vis-à-vis de l'acidification interne à des adaptations à des différences dans la polarisation de leur type cellulaire respectif, ou plus généralement du micro-environnement que connaissent ces canaux.

Une caractéristique intriguante du canal SOR est sa sensibilité à la concentration externe de  $\text{K}^+$ . Comme pour SKOR, la concentration en potassium à l'extérieur de la cellule régule l'activité du canal. Lorsque la concentration de  $\text{K}^+$  est diminuée de 100 à 10  $\text{mmol.l}^{-1}$ , le courant à travers le canal SOR augmente régulièrement, en accord avec les prévisions des lois de la thermodynamique. Par contre, lorsque la diminution de concentration se produit de 10 à

$0 \text{ mmol.l}^{-1}$ , le courant diminue. SOR étant un canal à rectification sortante, on peut s'attendre *a priori* à ce que plus la concentration en potassium externe diminue, plus le courant augmente. Il y a donc une anomalie de fonctionnement des canaux de type SKOR dans la gamme de concentration de 0 à  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Ce phénomène suggère que le potassium externe exerceait une régulation de type allostérique sur l'activité du canal, avec un "feed-back" positif. L'hypothèse retenue dans l'équipe est que cette régulation impliquerait une séquence de 8 acides aminés supplémentaires, caractéristiques du groupe SKOR, reliant la région S5 et le pore (sur la face externe de la membrane plasmique). Parmi ces 8 acides aminés, le tripeptide GDY évoque le motif GYGD du pore, qui constitue la séquence caractéristique des canaux fortement sélectifs de  $K^+$ , et joue un rôle déterminant dans la formation du filtre de sélectivité du canal (Heginbotham *et al.*, 1994; Jan et Jan, 1997). Plusieurs auteurs (Heginbotham et MacKinnon, 1992; Kumpf et Dougherty, 1993; Miller, 1993) ont montré que l'ion  $K^+$  peut établir des interactions de type "cation- $\pi$ " avec les noyaux benzène, qui forment le squelette de la chaîne latérale des acides aminés aromatiques. Le modèle prévoit que la structure tétramérique des canaux permet de regrouper dans le pore les 4 tyrosines (Y) des motifs GYGD en un plan équatorial. Les électrons des cycles insaturés des résidus Y stabiliseraient à ce niveau les ions  $K^+$ . L'aspartate pourrait être également impliqué dans les mécanismes de stabilisation. Le motif GDY, proche de la séquence GYGD, pourrait lui aussi être le siège d'interactions préférentielles avec les ions  $K^+$  externes. Les changements de conformations susceptibles de résulter de ces interactions pourraient expliquer en partie les phénomènes de modulation de l'activité du canal par la concentration externe de  $K^+$ .

#### 4.6.3 Analyse de l'expression

##### *Profil d'expression*

L'expression de *SOR* a été détectée dans tous les organes aériens testés : feuilles, tiges, jeunes rafles, ainsi que dans les baies, quel que soit leur stade de développement. Sa présence dans les racines n'a pas pu être testée de façon fiable, probablement à cause de la mauvaise qualité des préparations d'ARN racinaires. Ce profil d'expression diffère complètement de celui de *SKOR* chez *Arabidopsis*, dont les ARNm sont retrouvés au niveau du parenchyme xylémien des racines. En revanche, le profil d'expression de *SOR* semble plus proche de celui de *SKOR2* chez *Arabidopsis*, qui est détecté dans les tiges par Northern Blot, et par RT-PCR dans les autres organes aériens et dans des préparations enrichies en ARN de cellules de garde.

La comparaison des profils d'expression, et les analyses de séquence, de structure génique et de comportement fonctionnel suggèrent que *SOR* est effectivement l'orthologue de *SKOR2* chez la vigne. Une RT-PCR sur des extraits de cellules de garde de vigne pourrait apporter un argument supplémentaire en faveur de cette hypothèse.

### ***Fiabilité de la méthode de quantification***

Les quantifications de l'expression de *SOR*, telles que nous les avons effectuées, ne peuvent apporter que des résultats préliminaires. En effet, les conditions techniques de ce type de quantification favorisent l'addition d'erreurs de manipulation, se répercutant de façon importante sur la quantification finale, en particulier du fait de l'effet amplificateur de la PCR. Trois causes d'erreurs principales peuvent être considérées : (i) le pipettage de très faibles volumes à partir de solutions présentant une certaine viscosité; (ii) l'efficacité très variable des réactions de transcription inverse et de PCR (Freeman *et al.*, 1999) et du processus d'hybridation; (iii) la fiabilité de l'analyse statistique.

De plus, compte tenu des faibles quantités d'ARN disponibles et du temps que demande cette quantification, l'expérience n'a pu être faite qu'une seule fois. Un plus grand échantillonnage aurait permis de réduire l'importance des erreurs statistiques et de manipulation. Enfin, la méthode employée est "rudimentaire", il existe aujourd'hui des appareils de PCR mesurant en temps réel l'augmentation de la concentration des produits amplifiés par mesure de fluorescence. Les données fournies par ce type de matériel sont plus fiables, et les essais peuvent être répétés plusieurs fois sur une période restreinte.

### ***Variation de l'expression de SOR au cours du développement de la baie***

En tenant compte de la signification limitée que peuvent présenter les données quantitatives obtenues par notre méthode, les premières conclusions que l'on peut en tirer sont que :

- (i) l'abondance relative du transcrit *SOR* est équivalente dans les baies et dans les organes végétatifs : les rapports *SOR/EF1 $\gamma$*  sont du même ordre de grandeur.
- (ii) les variations d'expression détectées dans les baies au cours de leur développement suggèrent une légère diminution de la quantité relative des transcrits *SOR* au cours du développement de la baie.

Un des objectifs majeurs de l'étude de la maturation des baies est de trouver des marqueurs moléculaires permettant d'appréhender la mise en place de la véraison, de manière à faciliter la gestion des vignobles. L'expression de ces marqueurs doit être affectée par ce stade physiologique : augmentation, diminution, arrêt ou début d'expression. De tels marqueurs commencent à apparaître, correspondant à des gènes codant une chitinase, des enzymes de la voie de synthèse des anthocyanes, des protéines "thaumatin-like", des invertases vacuolaires (Boss *et al.*, 1996; Davies et Robinson, 1996; Robinson *et al.*, 1997; Tattersall *et al.*, 1997). Plus récemment, il a été montré que des protéines impliquées dans les

structures pariétales et des enzymes de réponse à divers stress (Davies et Robinson, 2000) sont des marqueurs de la véraison. *SOR*, sur la base des données que nous avons obtenues, ne fait vraisemblablement pas partie des marqueurs moléculaires caractéristiques. Son expression, quasi-stable tout au long du développement de la baie, suggère un rôle dans une fonction de base, peu sensible à la véraison et aux changements physiologiques qui l'accompagnent.

#### 4.6.4 Rôle potentiel de *SOR* dans la plante

Les caractéristiques électrophysiologiques de *SOR* révèlent un canal sortant. Il s'agit du premier canal potassique sortant de type Shaker que l'on identifie comme exprimé dans les parties aériennes de la plante. On le retrouve dans les feuilles, les tiges et les rafles, ainsi que dans les baies. La quantité relative de transcrits *SOR* semble diminuer légèrement au cours de la maturation de la baie. Dans cet organe, *SOR* pourrait être impliqué dans la décharge de potassium dans la baie à partir des tissus conducteurs, ou la translocation de ce cation vers les cellules de l'exocarpe, qui est le tissu le plus accumulateur de potassium au cours du développement (Possner et Kliewer, 1985; Coombe, 1987).

Divers auteurs (Possner et Kliewer, 1985; Coombe, 1987; Iland et Coombe, 1988) ont étudié l'accumulation du potassium dans la baie au cours de la maturation. Il ressort de ces diverses analyses que la quantité globale de potassium de la baie augmente régulièrement au cours du développement. Cependant, c'est au niveau de l'exocarpe que l'accumulation est la plus importante. Il a également été remarqué de fortes concentrations de potassium au niveau du "pinceau" de tissus conducteurs arrivant du pédicelle dans la baie (faisceau ventral), mais ces concentrations restent en deçà des concentrations observées dans l'exocarpe (Coombe, 1987). En revanche, les cellules de la pulpe contiennent très peu de potassium, en particulier celles qui jouxtent l'exocarpe. Le rôle de *SOR* pourrait s'inscrire dans le cadre de cette accumulation de potassium au niveau de l'exocarpe. En effet, ses caractéristiques électrophysiologiques nous apprennent que c'est un canal sortant, permettant des flux soutenus de potassium, il pourrait ainsi être impliqué dans la décharge du potassium des tissus conducteurs vers les cellules de l'exocarpe, et à un degré moindre vers les cellules centrales de la pulpe. Le potassium, comme la majeure partie des métabolites amenés dans les baies, arrive probablement principalement par le phloème. Il a en effet été montré (Creasy *et al.*, 1993) que le xylème présente des discontinuités apparaissant lors du ramollissement de la baie, et que ce phénomène est parfois accompagné d'une augmentation du flux phloémien. *SOR* pourrait donc intervenir dans la décharge potassique du phloème. Le fait que la quantité relative de transcrits *SOR* semble diminuer légèrement au cours de la maturation des baies n'est pas forcément en contradiction avec cette hypothèse et les données révélant une accumulation relativement constante de potassium dans les baies. Cette hypothèse pourrait être étayée ou infirmée par quantification de l'ARNm *SOR* au cours de développement de la baie, mais cette

fois en séparant les différents tissus (exocarpe, pulpe, vaisseaux conducteurs), comme l'avaient fait Kliewer et Possner (1985) et Coombe (1987) pour mettre en évidence des différences dans la répartition du potassium et d'autres solutés dans la baie.

La localisation de SOR dans les feuilles, les tiges et les jeunes rafles est à rapprocher de l'expression de SKOR2, lui aussi exprimé dans les organes aériens verts. SKOR2 semble être exprimé dans les cellules de garde de ces organes (Gaymard, non publié). Si l'on considère que SOR et SKOR2 ont des séquences très proches et des caractéristiques électrophysiologiques semblables entre elles et aux canaux potassiques sortants de cellules de garde caractérisés *in vivo* (Thiel et Wolf, 1997), il est possible que SOR soit également exprimé dans les cellules de garde de la vigne. Dans ce contexte, il serait intéressant de rechercher si SOR est exprimé au niveau des stomates de la baie. Les canaux potassiques sont des acteurs importants dans les mécanismes d'ouverture et de fermeture des stomates. La régulation des flux d'eau et du flux de transpiration de la baie est susceptible d'avoir un impact important sur la concentration des solutés dans la baie, et donc sur la qualité du moût.

Les questions soulevées au cours de cette discussion pourront être en grande partie résolues par la construction et l'analyse de plantes comportant la construction chimérique "promoteur SOR-GUS". Des analyses par hybridation *in situ* seraient probablement délicates à mener avec ce matériel et des gènes à faible expression comme ceux qui codent les canaux potassiques. Lorsque la localisation de l'expression de SOR sera résolue, nous pourrons peut-être envisager un moyen de contrôler l'arrivée de potassium dans la baie *via* ce canal, par transgénèse ou par croisements.

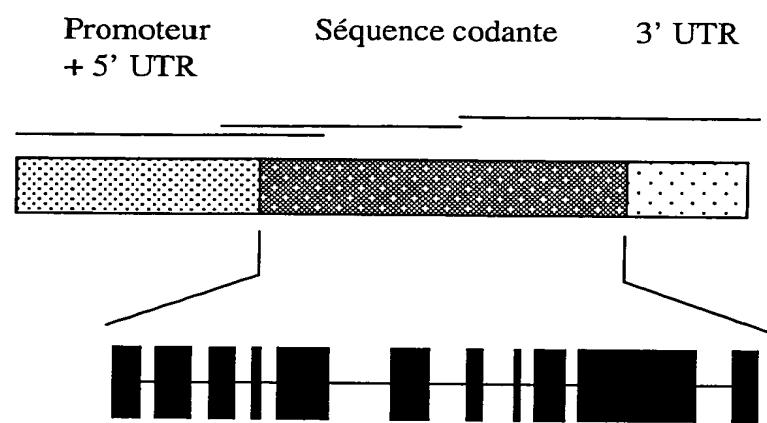


Figure 5.1 : représentation schématique de la structure du gène *SIRK*.

Les trois traits dans la partie supérieure du schéma figurent la position relative des trois clones, issus du criblage de la banque génomique, ayant permis de reconstituer le gène. Les exons sont indiqués par des rectangles noirs, séparés par les traits figurant les introns.

## Chapitre 5

### Caractérisation d'un canal potassique entrant exprimé dans les cellules de garde

Le criblage de la banque d'ADN génomique à l'aide d'une sonde AKT1/KAT1 a permis d'identifier trois clones dont les séquences sont chevauchantes. La séquence reconstituée comporte tous les éléments d'un gène complet : promoteur, séquence codante, séquences 5'UTR. Ce gène semble appartenir à la sous-famille des gènes *KAT*. Il a été appelé *VvSIRK*, pour Stomatal Inward Rectifying K<sup>+</sup> channel.

Ce chapitre traitera de l'analyse de la séquence du gène, de la caractérisation électrophysiologique de la protéine qu'il code, et de l'étude de son expression (localisation et variation de l'expression au cours du développement de la baie).

#### **5.1 Présentation de la séquence du gène *SIRK***

L'analyse de la séquence des trois clones issus du criblage de la banque génomique a montré qu'ils forment un gène unique. La séquence codante de ce gène compte environ 3,9 kpb. Nous disposons de plus de 3 kpb de promoteur /séquences 5'UTR, et de 1,7 kpb en aval du signal de terminaison de la traduction, comportant les séquences 3'UTR (figure 5.1).

##### **5.1.1 La séquence codante**

La séquence de l'ADNc *SIRK* a été déduite à partir de la séquence du gène *SIRK*, puis directement déterminée par RT-PCR et séquençage (*Cf.* § 5.2). La séquence protéique déduite correspond à celle d'un canal potassique de type Shaker, avec 6 segments transmembranaires, et un domaine de type P comportant le motif GYGD (figures 5.2 et 5.3). La séquence de SIRK présente le plus de similarité avec le polypeptide KAT2 : 70 % d'identité, contre seulement 56 % avec KAT1. En revanche, le domaine N-terminal de SIRK commence au même niveau que celui de KAT1, 12 résidus en aval de la première méthionine de KAT2 (figure 5.3).

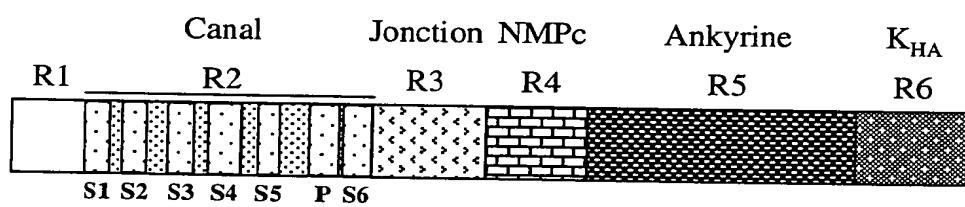


Figure 5.2 : représentation schématique de la protéine SIRK.

Six régions, R1 à R6, peuvent être distinguées à partir de l'analyse de la séquence de la protéine (nomenclature détaillée dans le chapitre 1, § 1.5.2). R2 correspond à la partie hydrophobe du canal, avec les six segments transmembranaires S1 à S6 et le segment P.

## R1

KAT1 1		MSISCTRNF	ERFCVEEYN	HDTIKQ	25			
KAT2 1	MLKRKHNLNT	RPM	MSISCTRNF	FKRFCVEEYN	YDTFKH	36		
SIRK 1		MSFS	CAKAF	QRF	CVEE	FROMERTSL	25	
1								
KAT1 26	SS	-FLSADLLPSL	GARINQ	STKLRKHI	ISPFPN	PRYRAWEM	64	
KAT2 37	SS	-FLSADLLPSL	GARINQ	STKLRKHI	ISPFDPR	EGRGWE	75	
SIRK 26	GSV	F-S	SHLLPSL	GARINQ	ATKLQ	KHIISPFDPR	YRAWEM	60

## R2

	S1			S2				
KAT1 65	WLVL	VLYSAWICPF	QFAFITYKKDA	IFIDNIVNGFFAIDII	LTLFFFVAY	114		
KAT2 76	WLVL	VLYSAWICPF	EFAFITYKKDA	LFIDNIVNGFFAIDII	LTLFFFVAY	125		
SIRK 61	LL	EILVLYSAWICPF	EFGFIPYKQDALF	IFDNIVNGFFAIDII	MLTLFFFVAY	109		
2								
	S3							
KAT1 115	LDSH	SYLLVD	SPKKIAIRY	YLSTWFAFDVC	STAPFQPLSLLF	NYNGSELGF	164	
KAT2 126	LDSH	SYLLVD	KPKKIAIRY	YLSTWFAFDVC	STAPFQSLSLLF	KYNGSEEGF	175	
SIRK 110	LD	EYLLVD	DAKKIAIRY	ESTWFI	FDVCSTAPFEAF	SLFLTKHN	SGLG	159
3								
	S4			S5				
KAT1 165	R	LSMLRLWRLRRV	SSLFARLEKD	I	RNYFWIRCTKLIS	VTLFAHCAGC	214	
KAT2 176	R	LSMLRLWRLRRV	SSLFARLEKD	I	RNYFWTRCTKLIS	VTLFAVHCAGC	225	
SIRK 160	KALN	MLRLWRLRRV	SSLFARLEKD	I	RNYFWIRC	IKLTS	VTLFAVHCAGC	209
4								
	P							
KAT1 215	FNYLIADRYPN	PRKTWIGAVYPNFKE	A	SLWNRYVTALYWSIT	TLLTTGYG	264		
KAT2 226	FAYLIADQYE	DPTKTWIGAVYPNFKE	TS	MWSRYVTALYWSIT	TLLTTGYG	275		
SIRK 210	FNYLIADRYPD	PERTWIGAVYPNFKEE	N	LWDRYVTS	TYWSIT	LLTTGYG	259	
5								
	S6							
KAT1 265	DF	HAE	NPREMLFD	IFFM	M	FNLGLTA	Y	301
KAT2 276	DL	HAE	NPREMLFF	F	MLF	NLGF	TSY	315
SIRK 260	DL	HAE	NPREMLFD	IE	MLF	NLGLT	SYLIGNMTNLVVH	296

## R3

KAT1 302	WT	SRT	RT	T	F	R	D	S	VRAASEFASRNQLP	H	DIE	EDQMLSHICLKFKTEGLKQQET	351	
KAT2 316	WT	SRT	TR	N	F	R	D	T	VRAASEFASRNQLPPN	I	QDQMLSHICLKFKTEGLKQQEA	365		
SIRK 297	WT	SRT	TR	D	F	R	D	T	VRSASEFA	R	IQDQMLSHICLKFKTEGLKQQDT	346		
6														
KAT1 352	LNNLP	KAIRSSIANYL	FFFPIV	H	Y	Y	L	F	QGVSRNF	L	FQL	VSDIDAEY	397	
KAT2 366	LNGLP	KAIRSSIANYL	FFFPIV	QNVYLF	H	G	V	S	RNF	L	FQL	VSDIDAEY	411	
SIRK 347	LNGLP	RAIRSSIAH	YLF	PIAQNVYLF	Q	D	F	L	QGV	S	E	V	AEY	393

R4

7

8

KAT1	398	F P P K E D I I L Q N E A P T D L Y I L V S G A V D F T V Y V D - G H D Q F Q G K A V I G E T F G E	446
KAT2	412	F P P R E D V I L Q N E A P T D L Y I L V S G A V D F T V Y V G - E E D Q V Q G K A V V G D A F G E	460
SIRK	394	F P P R E D V I L Q K E A S T D I Y I L V S G A V D L I A Y I D - G H D Q I L G K A V A G D V F G E	442
CAP		Y P S K S T L I I H Q G E K A E T L Y Y I V K G S V A V L I K D E E G K E M I L S Y L N Q G D F I G E	

KAT1	447	V G V L Y Y R P Q P F T	--	V R T T E L S Q I L R I S R T S L M S A M H A	481
KAT2	461	I G V L C Y T P Q P F T	--	V R T T E L S Q I L R I S K K S L M S A M R A	495
SIRK	443	I G V L C Y R P Q S L T	--	V R T S E L S Q I L R D S R T S L M N A Q R A	477
CAP		M G I F E E G - Q E R S A W V R A K T A C E		M A E I S Y K K F R Q L I Q V	

R5

!

KAT1 482 HAD D G R V I M N N L F M K L R G Q Q S I A I D D S N T S G H E N R D F K S M G W E E W R D S R K 531  
 KAT2 496 H V E D G R V I M N N L F M K L R G Q Q S I A I D D P N S E P E S I L K E W L V G G S K T G E G N A 545  
 SIRK 478 N M E D G P T I I M N H L F K K L K G L E S S G F T D P H M D P D S I L R E W T D G V P P G G S L S H 527  
 Anky - G - T P L H - A

KAT1	532	D G Y G L D V T N P T S D T A L M D A I H K E D T E M V K K I L K E Q K I E R A K E E R S S S E S A	581
KAT2	546	S D Q G H G H K Y L Q L H D S E N I D M G S T E W R D S R K S G Y G E T K R V R E H T I E I E E G E	595
SIRK	528	A G C H D Q S P H G D P S I Q E A R D I G L L G S E A T K K S -	558
Anky		A - - G H - - - V - - L L - - G A - - N - - - -   G - T P L H - A A - - G H - - - V - - L L - - G A	

KAT1	- - - - -													
KAT2	- - - - -													
SIRK	559	- KADKAHESTGC <span style="background-color: black; color: white;">G</span> IDANSAAED <span style="background-color: black; color: white;">G</span> QTA <span style="background-color: black; color: white;">L</span> HVA <span style="background-color: black; color: white;">V</span> CNG <span style="background-color: black; color: white;">H</span> LEMVRILLE <span style="background-color: black; color: white;">E</span> -RGANV		605										
Anky		G H - - V - - LL - - G A - - N - - -   G - T P L H A A - - - G H - - - V - - LL - - - G A - -												
		A	D		A		A		V		L L		G A	

**KAT1** -----  
**KAT2** -----  
**SIRK** 606 **N K K D A R - G W T P K A L A E Q E G K K S I Y D L L L S Y E N R R L L D E H K I H F I G S D A A D** 654  
**Anky** **N** - - - - | **G** - **T P L H** - **A A** - - **G H** - - **V** - - **L L** - - **G A** - - **N** - - - -  
**D** **A** **D**

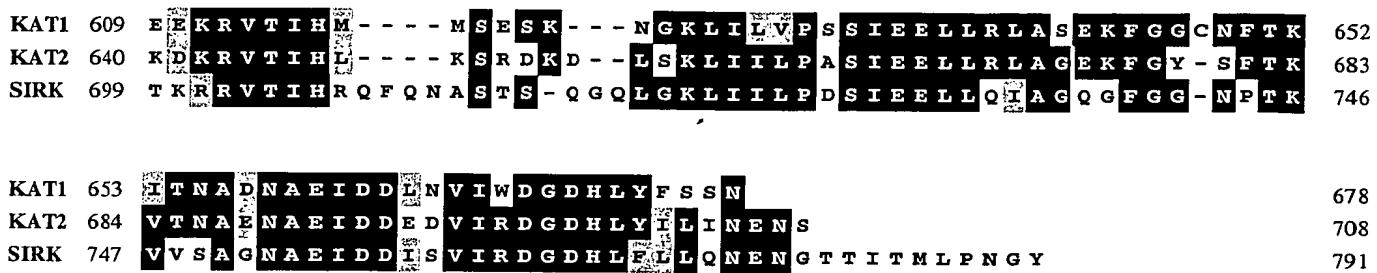


Figure 5.3 : alignement des séquences protéiques des canaux SIRK de vigne, KAT1 et KAT2 d'*Arabidopsis*. Les séquences sont alignées région par région. R1 : région N-terminale. R2 : domaine transmembranaire. R3 : domaine de jonction. R4 : domaine potentiel de fixation des nucléotides cycliques. R5 : domaine variable. R6 : domaine K<sub>HA</sub>. La position des segments transmembranaires de la région R2 est indiquée par un trait au-dessus des alignements. Elle a été déterminée en utilisant un programme de prédiction de ces structures à partir de la séquence primaire des protéines. La séquence de la protéine CAP d'*E.coli* a été alignée en-dessous des séquences de la région R4. La séquence du motif ankyrine (Anky, Lux *et al.*, 1990) a été alignée au-dessous des séquences de la région R5. Les nombres à gauche et à droite des alignements indiquent la position de l'acide aminé en regard dans la séquence polypeptidique. Les résidus identiques sont en noir. Les acides aminés appartenant au même groupe de substitution conservative sont indiqués sur fond gris clair. Les 7 groupes de substitution sont : 1: K et R; 2 : D et E; 3 : N et Q; 4 : A et G; 5 : S et T; 6 : I, M, L et V; 7 : F, W et Y. Les tirets correspondent à des décalages introduits pour maximiser les alignements. La position relative des introns dans les gènes codant ces protéines est indiquée par un trait vertical et un numéro placé au-dessus des alignements.

Position des introns	<i>KAT1</i>	<i>KAT2</i>	<i>SIRK</i>
1	AG-A 155	AG-G 97	AG-G 81
2	AG-G 84	AG-G 94	AG-G 104
3	AG-G 95	AG-G 99	AG-A 101
4	TCG- 154	TGT- 89	TCT- 109
5	TTT- 156	TTT- 123	TTT- 404
6	TTG- 82	TTG- 98	CTG- 232
7	GTG- 75	GTG- 91	GTG- 205
8		CAG- 91	CAG- 85
9	ATG- 75	ATG- 101	AAG- 88
10		G-GT 82	G-GT 234

Tableau 5.1 : position et longueur des introns des gènes des canaux potassiques *KAT1* et *KAT2* d'*Arabidopsis* et *SIRK* de vigne.

Le numéro du site d'insertion est défini par rapport aux alignements de la figure 5.3. La position de l'insertion dans un codon est figurée par un tiret. La longueur de chaque intron est indiquée par le nombre sous le codon d'insertion.

Les analyses de séquences révèlent une particularité intrigante dans SIRK, par rapport aux canaux de type KAT : SIRK possède une région qui présente 50 % de similarité avec le domaine ankyrine d'AKT1. Cette région comporte des acides aminés dans la disposition typique du motif ankyrine consensus (Lux *et al*, 1990) : -GTPLH--AA-GH---(V/A)--LL--GA--(N/D)---. Elle est constituée d'une moitié d'un motif ankyrine, suivie d'un motif complet puis d'un autre demi-motif, ce qui représente environ 90 nucléotides supplémentaires par rapport à KAT2. Ce fait est unique dans la famille des canaux potassiques végétaux de type Shaker. Les autres canaux identifiés comme appartenant au sous-groupe KAT ne présentent pas de répétitions de motifs ankyrine. Ce domaine ankyrine est donc la principale différence entre SIRK et les canaux de type KAT. Les autres différences se situent essentiellement dans le domaine C-terminal, mais sont peu marquées. Le domaine C-terminal de SIRK est un peu plus long que celui des protéines KAT.

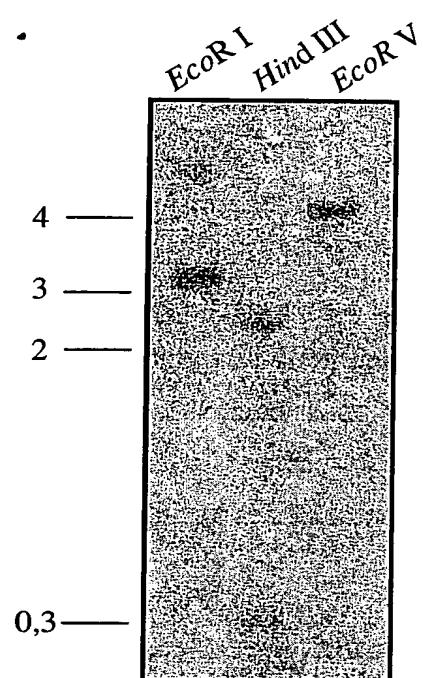
Les positions et tailles d'introns de *SIRK* ont été comparées à celles des gènes *KAT*. *SIRK* possède le même nombre d'introns que *KAT2*, positionnés de manière identique au nucléotide près (tableau 5.1). Il est intéressant de remarquer que la présence supplémentaire du domaine ankyrine chez *SIRK* ne modifie pas la structure génique de type *KAT2*. Cependant, la taille des introns de *SIRK* est plus hétérogène que celles de *KAT2* : de 81 à 404 pb pour contre 82 à 123 pour *KAT2*. C'est dans la région codant le domaine transmembranaire que les tailles d'introns des deux gènes sont les plus homogènes.

Enfin, il est également intéressant de noter que la taille des introns du gène *SIRK* est plus petite que celle des introns du second gène que nous avons cloné chez *Vitis*: *SOR*. L'intron le plus grand de *SIRK* ne compte en effet que 400 pb environ (Cf. chapitre 4, § 4.2.2).

### 5.1.2 Nombre de copies du gène

Le nombre de gènes de type *KAT* dans le génome de la vigne a été estimé par Southern blot. Un autoradiogramme est présenté sur la figure 5.4A. Nous avons digéré l'ADN génomique par *Hind III*, *EcoR I*, et *EcoR V*, qui coupent respectivement 5, 2, et 2 fois dans le gène *SIRK*. Compte tenu de la sonde utilisée, si seul *SIRK* est révélé, les bandes attendues sont au nombre de trois pour la digestion *Hind III* (dont un doublet aux environs de 300 pb), de deux pour *EcoR I* (dont l'une de haut poids moléculaire, faiblement révélée) et une seule pour *EcoR V* (figure 5.4B). Les profils observés (figure 5.4A) correspondent effectivement aux tailles attendues pour les restrictions du gène *SIRK*. Deux hypothèses peuvent alors être émises :

A



B

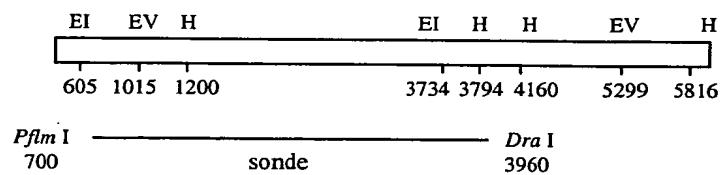


Figure 5.4 : Southern blot d'ADN génomique (cv Pinot noir ) hybridé avec une sonde *SIRK*.

A. ADN génomique hybridé par une sonde provenant de l'ADNc *SIRK*. Les positions et les tailles des marqueurs en kpb sont indiquées à gauche de l'autoradiogramme. Les enzymes utilisées pour la digestion de l'ADN génomique sont indiquées au-dessus des pistes correspondantes.

B. Carte de restriction du gène *SIRK*. Le rectangle représente la séquence codante du gène. La positions des sites de restrictions des enzymes utilisées en A est indiquée (EI : *EcoR I*, EV : *EcoR V*, H : *Hind III*). La sonde est constituée par le fragment *Pflm I-Dra I* de l'ADNc *SIRK*.

- (i) l'hybridation a été faite dans des conditions trop stringentes (hybridation et lavages à 65°C) pour révéler un gène parologue.
- (ii) il n'existe qu'un seul gène de type *KAT* dans le génome de la vigne.

Nous avons pu observer que lorsque le Southern blot est réalisé en conditions hétérologues (sonde correspondant aux ADNc des canaux KAT1 et KAT2) à basse stringence, le profil obtenu semble indiquer qu'un seul gène est présent (*Cf. chapitre 3, figure 3.1*). La seconde hypothèse est donc favorisée.

## 5.2 Clonage de l'ADNc *SIRK*

L'ADNc correspondant au gène *SIRK* n'a pas été détecté dans la banque d'ADNc de baies. Ne connaissant pas la localisation de l'expression de *SIRK*, mais supposant qu'il est l'orthologue de *KAT2* chez la vigne, nous avons recherché par RT-PCR sa présence dans des ARN extraits de feuilles. La réaction ayant fourni un résultat positif, nous avons entrepris le clonage de l'ADNc à partir des ARN de feuilles.

### 5.2.1 Principe technique du clonage

La première étape du clonage de l'ADNc *SIRK* a consisté à extraire de grandes quantités (environ 2,5 mg) d'ARN totaux de feuilles. Ceci a été réalisé au moyen d'un tampon d'extraction contenant du perchlorate de sodium (Fillion *et al.*, 1999), avec un assez bon rendement (62,5 µg/g matière fraîche). Les ARN polyA ont été extraits des ARN totaux, afin de favoriser la réaction de transcription inverse de l'ARN recherché. Nous avons obtenu environ 1,5 µg d'ARN polyA. Environ 500 ng ont été utilisés dans une réaction de transcription inverse à l'aide d'une amorce positionnée au niveau du codon de terminaison de la traduction. Un µl de cette réaction a servi de matrice à des réactions de PCR variées, utilisant diverses amorces "sens" contre l'amorce "antisens" ayant servi à la transcription inverse. L'amplification de l'ADNc complet en une seule réaction n'a pas été possible, nous avons donc choisi d'amplifier deux fragments chevauchants, puis de les rabouter après digestion (figure 5.5).

Les essais préliminaires d'amplification par PCR ont été réalisés à l'aide d'une ADN polymérase dont le taux d'erreur au cours de la polymérisation est important (*Extrapol*,

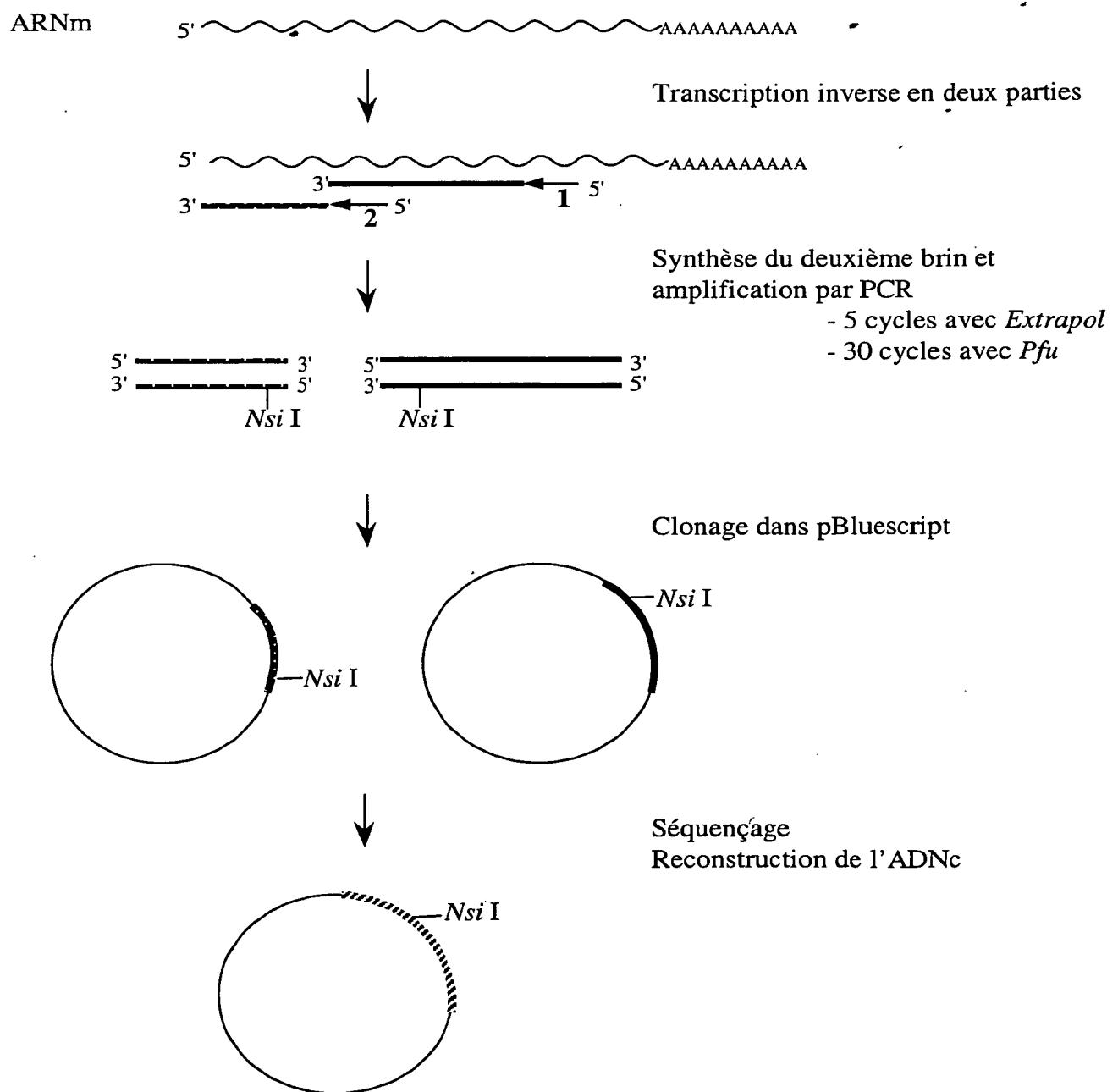


Figure 5.5 : principe de reconstruction de l'ADNc *SIRK*.

Environ 1,5 µg d'ARN messagers ont été purifiés à partir de 2,5 mg d'ARN totaux extraits de jeunes feuilles. Ces ARN polyA ont été rétro-transcrits à l'aide de deux amores spécifiques (1 et 2), générant deux séquences se recouvrant partiellement et possédant le même site de restriction unique *Nsi I*. Les deux produits de transcription inverse ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amores spécifiques. Afin de limiter le nombre d'erreurs possibles durant la PCR, l'enzyme *Pfu* est employée. Il a cependant été nécessaire auparavant de réaliser 5 cycles avec l'enzyme *Extrapol*, car l'amplification s'est révélée impossible en utilisant seulement la *Pfu* (Cf. texte, § 5.2.1). Les produits amplifiés sont clonés séparément, puis raboutés à l'aide du site de restriction *Nsi I*. Nous avons vérifié, par séquençage, à chaque étape, qu'aucune mutation n'a été introduite.

Eurobio). Or, en vue d'utilisations ultérieures de l'ADNc (expression dans l'ovocyte de xénope notamment), toute mutation doit être évitée. Les amplifications par PCR ont donc été répétées avec l'enzyme *Pfu* (Promega), dont le taux d'erreur est très faible. Cependant, cette enzyme présente des propriétés fonctionnelles difficiles à appréhender, dépendant souvent des amorces. Par exemple, certaines amorces conduisent à de très bonnes amplifications avec *Extrapol*, mais plus du tout avec *Pfu*. Plutôt que de définir de nouvelles amorces ne garantissant pas une bonne amplification, nous avons choisi de procéder à une amplification en deux étapes. La première étape a consisté à réaliser une pré-amplification avec un nombre très court de cycles avec l'enzyme *Extrapol*, afin d'enrichir le milieu réactionnel avec les séquences recherchées tout en limitant le nombre d'erreurs. Puis, dans une deuxième étape, une fraction aliquote de cette première réaction a été utilisée pour une amplification avec *Pfu*.

La mise au point de ce protocole a nécessité la réalisation de gammes de cycles de PCR avec *Extrapol*, afin de trouver le nombre de cycles minimum requis pour une bonne amplification ultérieure avec *Pfu*. Au final, une amplification de 5 cycles avec *Extrapol* (soit un enrichissement d'un facteur  $2^5 = 32$ ) s'est révélée suffisante pour obtenir une amplification correcte avec *Pfu*.

### 5.2.2 Résultats

Les deux premiers fragments obtenus à l'issue de ces mises au point ont été séquencés avant d'être raboutés. Nous n'avons détecté aucune mutation dans leur séquence par rapport à celle du gène, à l'exception de quelques différences sur des troisièmes bases de codons, généralement silencieuses et pouvant être attribuées à un polymorphisme (la séquence génomique vient du cv Danuta, l'ADNc de Pinot noir). Cependant, les deux fragments amplifiés comportaient encore chacun un intron, non épissé. Cela suggère que la quantité de transcrits *SIRK* est relativement faible<sup>1</sup>.

L'opération a été répétée une seconde fois, avec succès : les deux fragments amplifiés correspondaient exactement aux séquences attendues, à l'exception des mêmes polymorphismes que ceux observés précédemment. Les fragments ont alors été raboutés au

<sup>1</sup> Il a d'ailleurs été courant au cours des mises au point de ces PCR de retrouver des amplifiats correspondant à tous les intermédiaires d'épissage (non montré). Certains intufs ont une taille inférieure à 100 pb, et la résolution des gels d'électrophorèse ne permet pas toujours d'être certain de la taille du fragment amplifié, donc de l'épissage complet de l'ARN ayant servi de matrice pour sa synthèse.

niveau du site unique de restriction *Nsi* I (figure 5.5), et un dernier séquençage nous a permis de vérifier l'intégrité de la séquence. Il est intéressant de noter que la séquence ainsi obtenue correspond aux prévisions que nous avions faites à partir des clones génomiques, en particulier pour ce qui concerne la position des introns.

## 5.3 Caractérisation fonctionnelle de SIRK

### 5.3.1 travail préalable à l'expression dans les ovocytes de xénope

#### *Clonage dans un vecteur d'expression*

L'expression d'un ADNc végétal dans l'ovocyte de xénope requiert son clonage dans un vecteur d'expression approprié aux cellules animales. Le vecteur pCI (Cf. chapitre 2, § 2.8.1) est le plus couramment utilisé dans notre équipe, parce qu'il permet une expression directe à la fois dans l'ovocyte de xénope et dans les cellules en culture COS ou CHO. Cependant, il n'a pas été possible de cloner l'ADNc *SIRK* dans ce vecteur. Malgré plusieurs stratégies de clonage (clonage à bouts francs ou clonage orienté), l'ADNc ne s'est inséré que rarement dans le vecteur, et, en dépit de l'orientation du clonage, toujours en sens inverse : le codon initiateur de la traduction se situait du côté du terminateur, et le codon "stop" du côté du promoteur. Ces difficultés pourraient résulter d'une structure secondaire particulière de cet ADNc, ou de sa toxicité pour les bactéries, comme cela a déjà été remarqué pour *AKT2* (I. Chérel, communication personnelle).

Nous avons alors tenté de cloner l'ADNc *SIRK* dans le vecteur de transcription *in vitro* pGEMHE (Liman *et al.*, 1992), qui comporte le promoteur de l'ARN polymérase du phage T7 et les séquences 3' et 5' UTR du gène de la β-globine du xénope. Ces séquences permettent d'augmenter l'expression de l'ADNc dans l'ovocyte de xénope (Liman *et al.*, 1992). Après transcription *in vitro*, les ARN obtenus sont injectés dans l'ovocyte.

L'efficacité de clonage de l'ADNc *SIRK* dans pGEMHE a été très faible, mais une construction correcte a pu être obtenue.

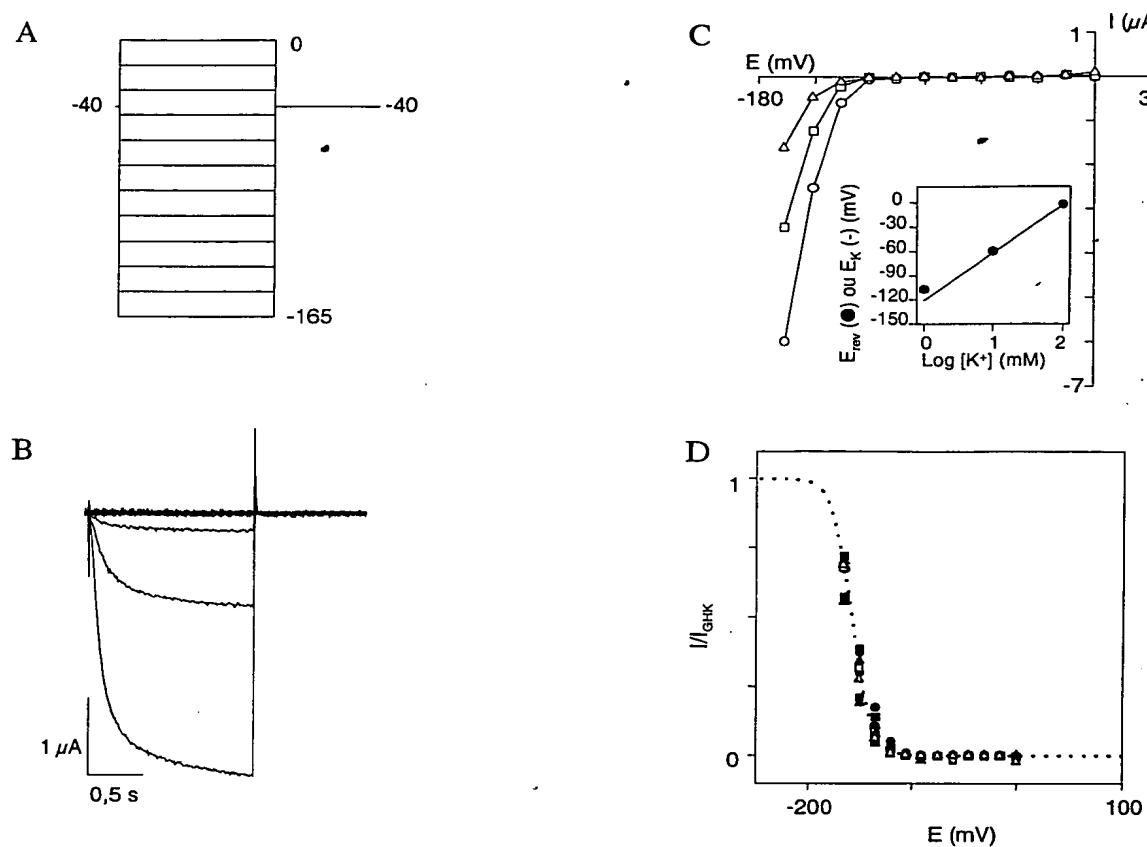


Figure 5.6 : caractérisation fonctionnelle de SIRK dans l'ovocyte de xénope par la méthode du voltage-clamp à deux électrodes.

Les ovocytes ont reçu une injection de 20 ng d'ARNc SIRK 2 à 7 jours avant les enregistrements, réalisés en voltage-clamp à deux électrodes. La solution de bain contient: XCl 100 mM ( $[X^+] = [K^+] + [Na^+]$ ), CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, HEPES-NaOH 10 mM (pH 7,4).

A. Protocole de voltage imposé. Le potentiel de maintien est de -40 mV. Douze épisodes successifs de 1,5 s sont réalisés à des potentiels allant de 0 à -165 mV (pas de -15 mV).

B. Traces de courant enregistrées en réponse au protocole présenté en A dans une solution contenant K<sup>+</sup> 100 mM.

C. Courbes courant-voltage. Les valeurs de courant à l'état stationnaire obtenues pour 3 concentrations externes en K<sup>+</sup> (100 mmol.l<sup>-1</sup> : cercles, 10 mmol.l<sup>-1</sup> : carrés et 1 mmol.l<sup>-1</sup> : triangles) sont représentées en fonction du potentiel de membrane correspondant (A). Encart : potentiel d'inversion (E<sub>rev</sub>) du courant SIRK pour différentes concentrations de K<sup>+</sup> (cercles), la ligne pleine représente le potentiel d'équilibre de K<sup>+</sup> (E<sub>K</sub>) calculé avec l'équation de Nernst.

D. Analyse de la sensibilité de SIRK au voltage pour 3 concentrations externes en K<sup>+</sup> (n=3 ovocytes). Les courbes I=f(E) sont modélisées avec l'équation :

$$I = I_{GHK} / [1 + \exp(F.z_a(E - E_{a50})/R/T)]$$

où I<sub>GHK</sub> est le courant de Goldman-Hodgkin-Katz égal à :

$G_1 \cdot E \cdot [1 - \exp(F \cdot (E - E_{rev})/R/T)] / (1 - \exp(F \cdot E/R/T))$ . G<sub>1</sub>, z<sub>a</sub> et E<sub>a50</sub> sont les paramètres ajustables de cette modélisation. G<sub>1</sub> est la conductance entrante limite (Véry *et al.*, 1995; Lacombe et Thibaud, 1998); E<sub>a50</sub> est le potentiel de demi-activation du canal; z<sub>a</sub> est la charge équivalente impliquée dans l'ouverture du canal; E, E<sub>rev</sub>, F, R et T ont leur signification habituelle.

Chacune des valeurs de I du panneau C est divisée par la valeur correspondante de I<sub>GHK</sub> et représentée en fonction de E (chaque symbole correspond à un ovocyte ou une concentration de K<sup>+</sup> différents. La courbe en pointillés représente le terme 1/(1+exp(F.z<sub>a</sub>(E-E<sub>a50</sub>)/R/T)) en fonction de E.

### ***Transcription in vitro***

La première étape de la transcription *in vitro* est la linéarisation du plasmide contenant l'ADNc, en aval des séquences 3'UTR de  $\beta$ -globine, de manière à ce que l'ARN polymérase du phage T7 puisse agir. Ensuite, la réaction de synthèse a lieu (*Cf.* chapitre 2, § 2.8.1), dans un environnement dépourvu de RNase. Enfin, la matrice ADN est éliminée par une DNase, et la qualité des ARN produits est vérifiée sur gel d'électrophorèse dénaturant.

En général, une réaction de transcription *in vitro* permet d'obtenir une vingtaine de  $\mu\text{g}$  d'ARN. Nous n'avons obtenu que 8  $\mu\text{g}$  au mieux au cours des différentes réactions menées, ce qui semble accréditer l'hypothèse d'une structure secondaire au sein de l'ADNc, qui perturbe son clonage et son expression hors de la plante.

### **5.3.2 Caractérisation fonctionnelle**

La caractérisation fonctionnelle du canal SIRK a été effectuée par Benoît Lacombe au Laboratoire.

Dix à 20 ng d'ARNc *SIRK* ont été injectés par ovocyte. Les ovocytes exprimant le canal ont été sélectionnés de manière fonctionnelle, en les soumettant à un épisode d'activation à -140 mV à partir d'un potentiel de maintien de -40mV, dans une solution contenant du KCl 100 mM. Seuls les ovocytes présentant des courants entrants d'intensité supérieure à 2  $\mu\text{A}$  dans ces conditions sont conservés pour la suite des analyses. Les caractéristiques fonctionnelles que nous avons analysées par la méthode du voltage-clamp à deux électrodes sont la sensibilité du canal au voltage, sa sélectivité et l'effet du pH sur son activité. Nous avons également analysé la conductance unitaire du canal par la méthode du patch-clamp.

#### ***Sensibilité au voltage***

L'effet du potentiel de membrane sur l'activité du canal SIRK a été étudié à l'aide de protocoles de voltage-clamp classiques exécutés depuis un potentiel de maintien de -40 mV, dans une solution de bain contenant  $\text{K}^+$  100 mM. Douze épisodes successifs d'activation ont été réalisés, à des potentiels compris entre 0 et -165 mV (incrément de -15 mV entre 2 épisodes). Leur durée est de 1,5 s (figure 5.6A). La réponse des canaux à cette stimulation est présentée à la figure 5.6B. L'activation du courant est lente. Les valeurs du courant à l'état stationnaire sont reportées sur un graphe en fonction du potentiel imposé (figure 5.6C). On

Canal	$z_a$	$E_{a50}$
SIRK	$2,78 \pm 0,02$ (n=5)	$-161 \pm 1$ (n=5)
KAT2	$2,5 \pm 0,1$ (n=7)	$-152 \pm 3$ (n=7)
KAT1	$1,6 \pm 0,1$ (n=7)	$-130 \pm 3$ (n=7)

Tableau 5.2: paramètres d'activation des canaux SIRK, KAT2 et KAT1 obtenus par l'analyse des courants stationnaires.

Les ovocytes ont reçu une injection de 20 ng d'ARNc *SIRK* 2 à 7 jours avant les enregistrements, réalisés en voltage-clamp à deux électrodes. La solution de bain contient : KCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; HEPES-NaOH 10 mM (pH 7,4).

Les valeurs du courant à l'état stationnaire sont ajustées comme décrit dans la légende de la figure 5.6D.  $z_a$  est la charge équivalente impliquée dans l'ouverture du canal, et  $E_{a50}$  est le potentiel de demi-activation du canal.

Les résultats sont des moyennes ± ES (n = nombre d'ovocytes) obtenues à partir de différents lots d'ovocytes.

pHe / pH <sub>i</sub>	$z_a$	$E_{a50}$
7,5 / 7,4	$2,79 \pm 0,08$ (n=4)	$-158 \pm 2$ (n=4)
6,0 / 7,4	$2,80 \pm 0,07$ (n=4)	$-129 \pm 2$ (n=4)
7,0 / 7,4	$2,80 \pm 0,01$ (n=4)	$-151 \pm 2$ (n=4)
7,0 / 7,0	$2,79 \pm 0,02$ (n=4)	$-142 \pm 3$ (n=4)

Tableau 5.3 : paramètres d'activation du canal SIRK en fonction du pH.

Les ovocytes ont reçu une injection de 20 ng d'ARNc *SIRK* 2 à 7 jours avant les enregistrements, réalisés en voltage-clamp à deux électrodes. Les solutions de bain sont identiques à celle de la figure 5.7.

Les valeurs du courant à l'état stationnaire sont ajustées comme décrit dans la légende de la figure 5.6D.  $z_a$  est la charge équivalente impliquée dans l'ouverture du canal, et  $E_{a50}$  est le potentiel de demi-activation du canal.

Les résultats sont des moyennes ± ES (n = nombre d'ovocytes) obtenues à partir de différents lots d'ovocytes.

observe que le courant macroscopique, qui circule à travers la population de canaux SIRK exprimés sur la membrane de l'ovocyte, n'apparaît que pour des potentiels plus négatifs que -100 mV. Le courant SIRK présente donc une forte rectification entrante. L'étude du courant instantané (résultats non montrés) dans des solutions de bain contenant des concentrations de K<sup>+</sup> de 100, 10 et 1 mmol.l<sup>-1</sup> révèle que le potentiel d'inversion du courant SIRK ( $E_{rev}$ ) suit le potentiel d'équilibre de K<sup>+</sup> ( $E_K$ ) (figure 5.6C, encart). Cette propriété signifie que le canal SIRK est très sélectif du K<sup>+</sup> par rapport aux autres ions de la solution de bain : Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>.

L'analyse des valeurs du courant stationnaire (légende de la figure 5.6D; procédure détaillée de l'analyse : Véry *et al*, 1995; Lacombe et Thibaud, 1998) pour différents potentiels nous permet de déterminer la valeur des paramètres  $E_{a50}$  et  $z_a$  caractérisant la sensibilité du canal SIRK au voltage (figure 5.6D).  $E_{a50}$  est le potentiel de demi-activation (valeur de potentiel pour laquelle la moitié des canaux sont ouverts), et  $z_a$  est la charge équivalente impliquée dans l'ouverture du canal<sup>1</sup>. Tous les points résultant de cette analyse correspondent à des conditions de K<sup>+</sup> externes différentes, et se superposent à la courbe représentant l'ajustement par l'équation de Boltzmann. Cela montre que l'activation du canal est insensible à la concentration externe en K<sup>+</sup>. C'est également le cas pour les canaux KAT1 (Véry *et al*, 1995; Lacombe et Thibaud, 1998) et KAT2 (Lacombe, 2000) d'*Arabidopsis*. Le potentiel de demi-activation de SIRK est plus négatif que celui des canaux KAT1 et KAT2 (tableau 5.2). SIRK présente une charge apparente de gating plus grande que KAT1 et KAT2 (tableau 5.2) : autrement dit, lorsque le potentiel membranaire devient plus négatif que le potentiel d'activation, la sensibilité de SIRK aux variations de voltage, dans la zone d'activation du canal, est plus grande que celle des canaux KAT1 et KAT2. Enfin, concernant la comparaison de SIRK avec chacun des canaux KAT1 et KAT2, l'analyse des données du tableau 5.2 indique que la sensibilité au voltage de SIRK est plus proche de celle de KAT2.

### Sélectivité du canal

Comme dans le cas du canal SOR (Cf. chapitre 4, § 4.3.1), la sélectivité du canal SIRK vis-à-vis des cations alcalins est appréciée par la détermination des rapports de perméabilité de ces cations et du potassium. Les valeurs obtenues pour ces rapports sont  $P_{Rb}/P_K=0,31 \pm 0,01$  ( $n=3$ ) et  $P_{Na}/P_K < 2 \cdot 10^{-3}$  ( $n=3$ ). Ces rapports nettement inférieurs à 1 signifient que le canal est très

<sup>1</sup>Dans le modèle utilisé pour décrire la sensibilité du canal au voltage, basé sur la relation de Boltzmann,  $z_a$  est la charge électrique théorique du senseur de voltage du canal, que l'on imagine traverser la membrane

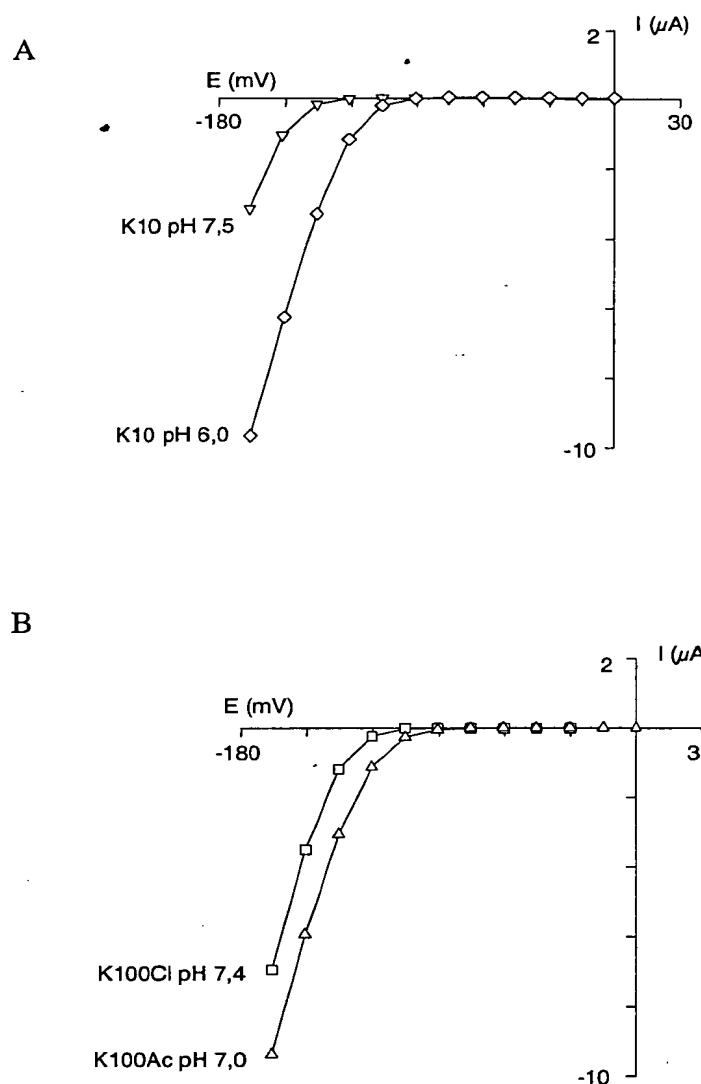


Figure 5.7 : sensibilité de SIRK au pH externe et interne.

Les ovocytes ont reçu une injection de 10 ng d'ARNc *SIRK* 2 à 7 jours avant les enregistrements, réalisés en voltage-clamp à deux électrodes. Les solutions de bain pour l'étude du pH externe (pHe) contiennent: KCl 10 mM, NaCl 90 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM et HEPES-NaOH 5 mM (pH 7,4) ou Tris-MES 5 mM (pH 6,0). Les solutions de bain pour l'étude du pH interne (pHi) contiennent: CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, HEPES-NaOH 5 mM et KCl 100 mM (pHi 7,4) ou K-Acéteate 100 mM (pHi 7,0).

**A.** Courant à l'état stationnaire en fonction du voltage dans K<sup>+</sup> 10 mM pour deux valeurs de pH extracellulaire : 7,5 (triangles) et 6,0 (losanges).

**B.** Courant à l'état stationnaire en fonction du voltage dans K<sup>+</sup> 10 mM pour deux valeurs de pH intracellulaire : 7,4 (carrés) et 7 (triangles).

sélectif du potassium, comme les canaux KAT1 et KAT2 (Véry *et al.*, 1995; Pilot *et al.*, J. Biol Chem, sous presse).

### ***Effet du pH sur l'activité du canal***

La sensibilité du canal SIRK au pH a été examinée en soumettant les ovocytes à des acidifications du pH externe ou interne.

Le canal SIRK est sensible à l'acidification du pH externe. Le passage de pH 7,5 à 6 provoque un déplacement du potentiel d'activation du canal vers des potentiels moins négatifs (figure 5.7A). Le potentiel de demi-activation du canal ( $E_{a50}$ ) est ainsi déplacé de -158 à -129 mV (tableau 5.3). En revanche, la valeur de  $z_a$  ne change pas. Cela signifie que, pour un potentiel donné, le courant SIRK est augmenté par l'acidification.

La figure 5.7B présente les effets d'une acidification intracellulaire. Le passage de pH 7,4 à pH 7 se traduit ici aussi par un déplacement du potentiel d'activation du canal vers des potentiels moins négatifs (figure 5.7B). La valeur du potentiel de demi-activation passe de -151 à -142 mV, tandis que la valeur de  $z_a$  est inchangée (tableau 5.3). L'acidification interne, comme l'acidification externe, conduit donc à une activation des canaux plus précoce.

Des observations analogues concernant les effets du pH externe ont été décrites dans le cas des canaux KAT2 (Pilot *et al.*, J. Biol Chem, sous presse) et KAT1 (Hedrich *et al.*, 1995). Cependant, les données obtenues au laboratoire pour KAT1 ont conduit à conclure que la valeur de  $E_{a50}$  est insensible au pH (Véry *et al.*, 1995; B. Lacombe, communication personnelle). Nous ne comprenons pas cette contradiction entre les données obtenues au laboratoire et celles publiées par d'autres groupes. Notons cependant que les données du laboratoire appuient l'hypothèse que le canal de vigne SIRK serait fonctionnellement plus proche de KAT2 que de KAT1. Cette différence caractéristique entre KAT1 et KAT2 permet de rapprocher SIRK de KAT2.

### ***Effet du césium sur l'activité du canal***

Le césium est un agent bloquant caractéristique des canaux potassiques. Cet ion, dont le rayon à l'état déshydraté est supérieur à celui de  $K^+$ , pénètre toutefois dans le pore, au sein duquel il se bloque, empêchant le flux entrant (Tester, 1988). L'effet de  $Cs^+$  sur l'activité du canal SIRK

---

complètement, d'une face à l'autre, lors de l'ouverture du canal.

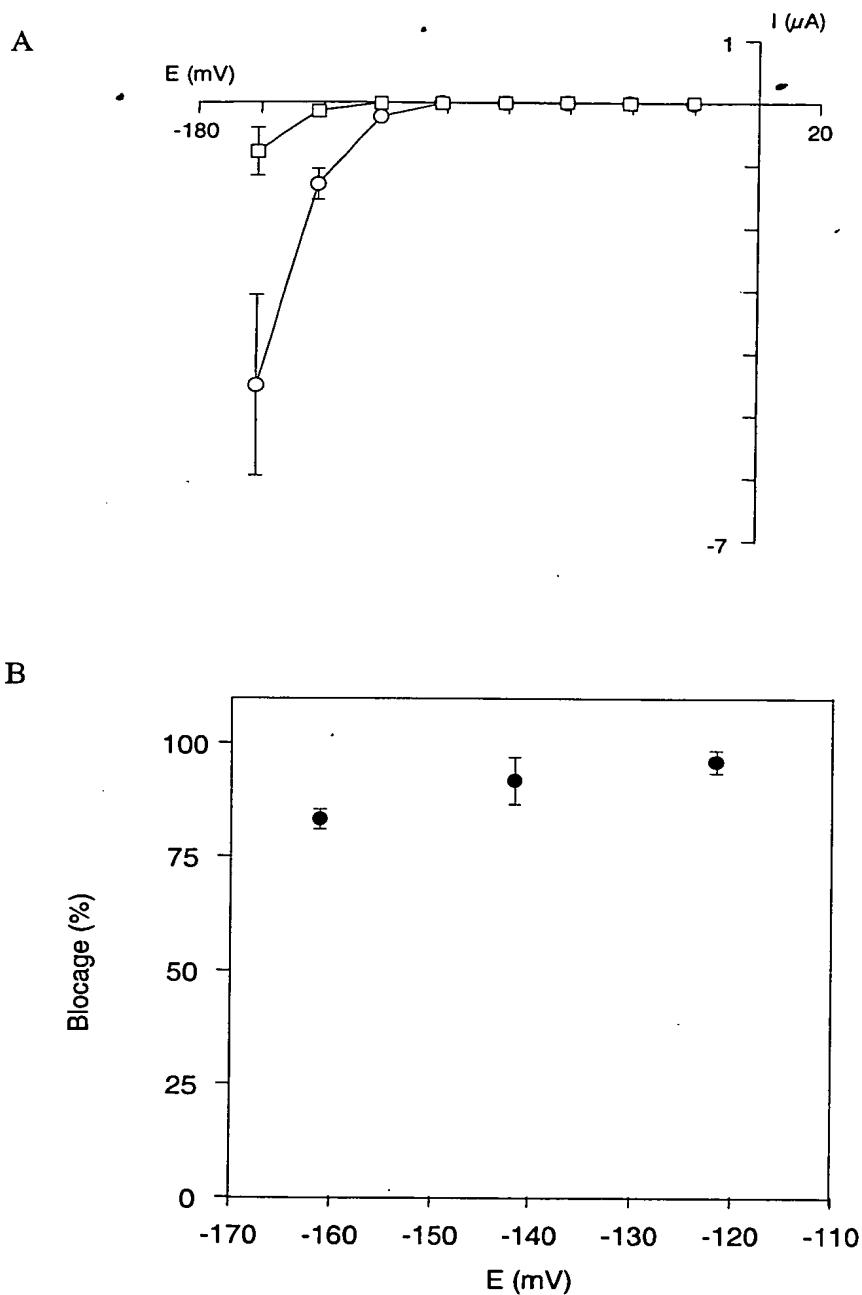


Figure 5.8 : sensibilité de SIRK à la concentration externe de césium.

Les ovocytes ont reçu une injection de 20 ng d'ARNc *SIRK* 2 à 7 jours avant les enregistrements, réalisés en voltage-clamp à deux électrodes. La solution de bain contient: KCl 10 mM, NaCl 90 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, HEPES-NaOH 10 mM (pH 7,4), en présence ou en absence de CsCl 0,1 mM.

A. Courbes courant-voltage en absence (cercles) ou en présence (carrés) de Cs<sup>+</sup>.

B. Pourcentage de blocage en fonction du potentiel.

Les résultats sont des moyennes ± ES (n=3 ovocytes).

a donc été testé. Les courbes I/V présentées sur la figure 5.8A indiquent qu'en présence de Cs<sup>+</sup>, l'amplitude du courant SIRK est très nettement inférieure à l'amplitude du courant dans un milieu dépourvu de Cs<sup>+</sup>. Le blocage exercé par Cs<sup>+</sup> 0,1 mM dans K<sup>+</sup> 10 mM est toujours proche de 80 à 90 %, quelle que soit la valeur du potentiel : autrement dit, ce blocage n'est donc pas dépendant du potentiel (figure 5.8B). De ce point de vue, SIRK est plus proche de KAT2 (dont le blocage par Cs<sup>+</sup> est également voltage-indépendant; Pilot *et al.*, J. Biol Chem, sous presse) que de KAT1 (blocage voltage-dépendant; Véry *et al.*, 1994).

Les séquences primaires des domaines P de KAT1 et KAT2 ne diffèrent que par un seul acide aminé. Des études de mutagénèse dirigée visant à introduire l'acide aminé caractéristique de KAT2 dans le pore de KAT1 (F256L) n'ont pas permis de découvrir la cause de ces différences.

#### *Analyse par la méthode du patch-clamp*

Le canal SIRK a également été analysé par la méthode du patch-clamp, qui nous permet d'accéder aux propriétés unitaires du canal. Les mesures ont été effectuées sur des ovocytes ayant un fort niveau d'expression du canal SIRK, à l'aide de "grosses" pipettes (entre 0,8 et 1,2 MΩ) selon le protocole décrit dans la figure 5.9A, en configuration cellule attachée. Des courants "macroscopiques" (entre -100 et -1000 pA à -150 mV) ont été enregistrés. Les courbes décrivant l'activation progressive des canaux à différents voltages en fonction du temps (figure 5.9B) sont similaires à celles obtenues par voltage-clamp à deux électrodes (figure 5.6B). Il existe un autre moyen, plus rapide et moins traumatisant pour les cellules, de déterminer les valeurs de courant à l'état stationnaire. Il s'agit d'appliquer un "protocole de rampe". Cela consiste, à partir d'un potentiel de maintien de 0 mV, à hyperpolariser la membrane à -180 mV pendant 3,5 s de manière à atteindre l'état stationnaire, puis à remonter lentement l'échelle des potentiels jusqu'à 0 mV. Ce lent parcours des potentiels équivaut à ce que les canaux soient à chaque instant dans un état assimilé à l'état stationnaire, et "glissent" donc d'un état stationnaire à un autre. Ce protocole est présenté sur la figure 5.9C, avec, sur la figure 5.9D, la réponse des canaux du patch. Cette réponse est comparée aux courbes I/V obtenues par l'analyse des courants stationnaires enregistrés par la méthode du patch-clamp et par la méthode du voltage-clamp à deux électrodes (figure 5.9E). Les trois courbes se superposent, ce qui confirme la validité de l'analyse par le protocole de rampe. On peut remarquer que travailler en patch-clamp permet de tester le canal à des potentiels de membrane plus négatifs qu'en voltage-clamp à deux électrodes (-195 au lieu de -165 mV).

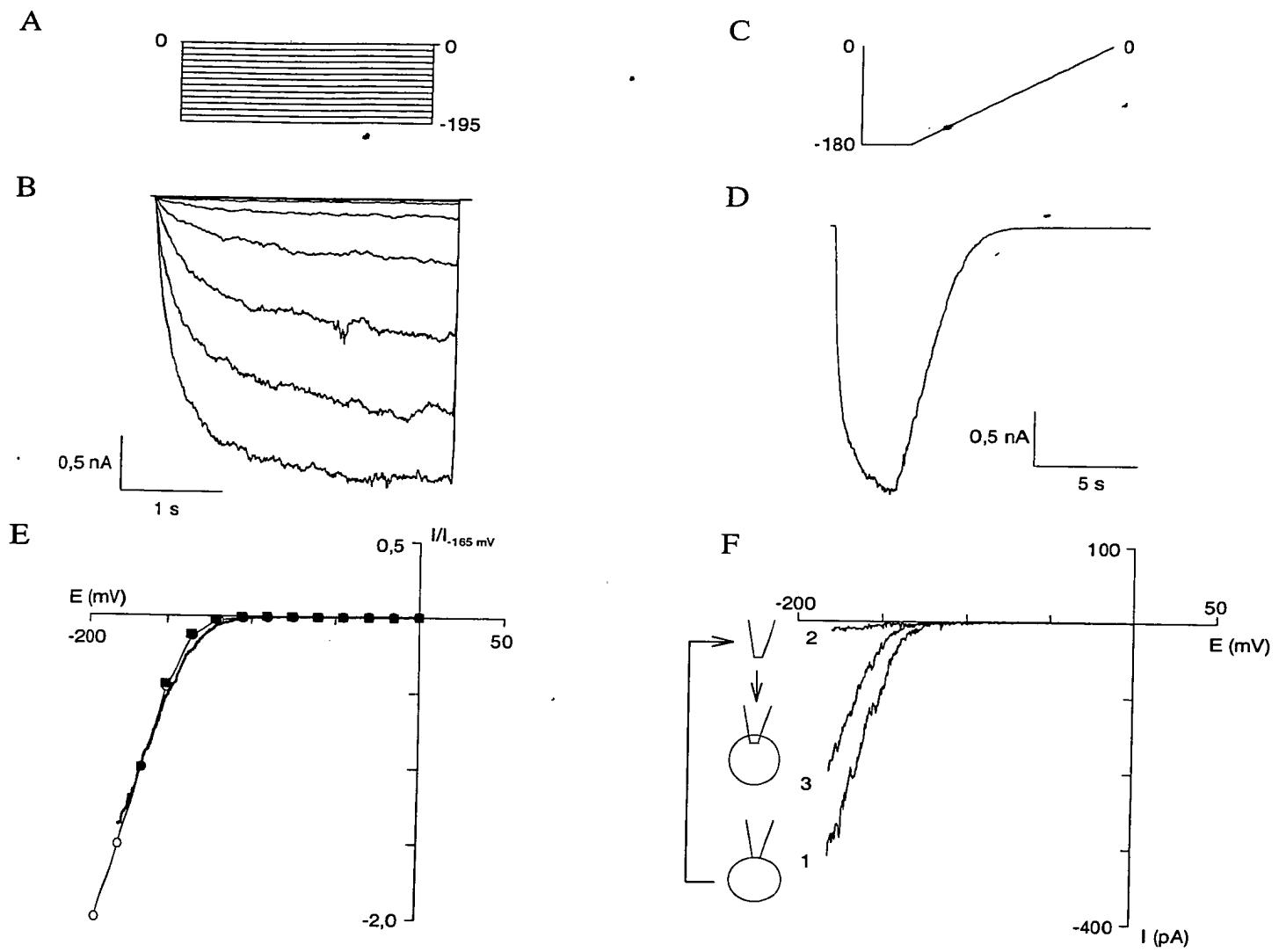


Figure 5.9 : caractérisation fonctionnelle de SIRK dans l'ovocyte de xénope par la méthode du patch-clamp: analyse des courants macroscopiques.

Les ovocytes ont reçu une injection de 10 ng d'ARNc SIRK 2 à 7 jours avant les enregistrements, réalisés en patch-clamp mode "cellule-attachée" ou "inside-out". Les solutions de bain et de pipette contiennent : KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, HEPES-NaOH 10 mM (pH 7,5).

**A.** Protocole de voltage imposé. Le potentiel de maintien est de 0 mV; 14 épisodes successifs de 3 s sont réalisés à des potentiels allant de 0 à -195 mV (pas de 15 mV).

**B.** Traces de courant enregistrées, en configuration "cellule attachée", en réponse au protocole présenté en A dans une solution contenant 100 mmol.l<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup>.

**C.** Protocole de "rampe". Le potentiel de maintien est de 0 mV.

**D.** Traces de courant enregistrées, en configuration "cellule attachée", en réponse au protocole présenté en C dans une solution contenant 100 mmol.l<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup>.

**E.** Comparaison des courbes courant/voltage (normalisées par rapport à la valeur de courant enregistrée à -165 mV) obtenues en voltage clamp à deux électrodes (carrés) et en patch-clamp configuration "cellule-attachée" (cercle, courbe obtenue à partir de B, et trait épais, courbe obtenue avec le protocole de "rampe" D).

**F.** Courants enregistrés en réponse à un protocole de rampe (entre -180 et 0 mV, Cf. C). Le premier enregistrement (1) est réalisé en mode "cellule-attachée". Ensuite le patch est excisé (mode "inside-out" : face cytoplasmique exposée au bain) (2). Enfin, le patch est ramené dans l'ovocyte ("patch-cramming") au contact du cytoplasme (3).

Sur la base de ces conclusions, la technique du protocole de rampe a été adoptée pour étudier les effets de facteurs cytoplasmiques sur l'activité du canal (figure 5.9F). A partir de la configuration cellule attachée, le patch est excisé, de façon à obtenir la configuration "inside-out". Cette excision provoque la disparition du courant. Lorsque l'on replace le bout de membrane excisé dans l'ovocyte, le courant réapparaît. Ces résultats indiquent que le canal doit être en présence de facteurs cytoplasmiques pour fonctionner.

La configuration "cellule attachée" nous permet d'accéder aux propriétés unitaires des canaux, s'ils sont en nombre restreint dans le patch, ce qui a été obtenu lors de l'enregistrement présenté sur la figure 5.10A, à différentes valeurs de potentiels. Cet enregistrement montre que plus l'hyperpolarisation de la membrane est importante, plus le nombre de canaux ouverts est grand : à -100 mV, un seul canal, ouvert brièvement; à -125 mV, trois canaux ouverts, le troisième n'étant ouvert que pendant 10 ms environ; à -140 mV, 4 niveaux d'ouverture. Il y a donc un effet du potentiel sur la probabilité d'ouverture des canaux dans le patch.

La figure 5.10B compare les cinétiques d'activation de ces canaux à celle du courant macroscopique SIRK. La courbe correspondant au patch-clamp est tracée en additionnant les enregistrements obtenus pour 200 épisodes d'hyperpolarisation à -140 mV, tels que celui présenté sur la figure 5.10A. La courbe ainsi obtenue présente une allure relativement similaire à la courbe expérimentale obtenue par voltage-clamp à 2 électrodes. Cela indique que les courants unitaires détectés (figure 5.10A) résultent effectivement de l'activité des canaux SIRK.

L'intensité des courants unitaires détectés est présentée en fonction du potentiel imposé sur la figure 5.10C. L'intensité des courants est déterminée par l'analyse des histogrammes d'amplitude construits d'après les données de la figure 5.10A (non montré; pour plus de détails, voir le chapitre 4.3.2). L'ajustement par régression linéaire des données courant/voltage sur la figure 5.10C (droite en pointillés) permet de déterminer la valeur de la conductance unitaire des canaux SIRK : 13 pS lorsque la concentration en K<sup>+</sup> externe est de 100 mmol.l<sup>-1</sup>. Dans les mêmes conditions, la conductance unitaire de KAT1 et de KAT2 est de 5-6 pS (Hedrich *et al*, 1995; Hoshi *et al*, 1995; Lacombe, 2000), tandis que celle d'AKT1 est de 10 pS (Horeau, 1998). SIRK est donc, comme les autres canaux de type Shaker végétaux, un canal à faible conductance.

- Enfin, l'étude de la sensibilité de SIRK au voltage par la méthode du patch-clamp (figure 5.10D) permet de déterminer la probabilité de l'état ouvert des canaux SIRK contenus dans le

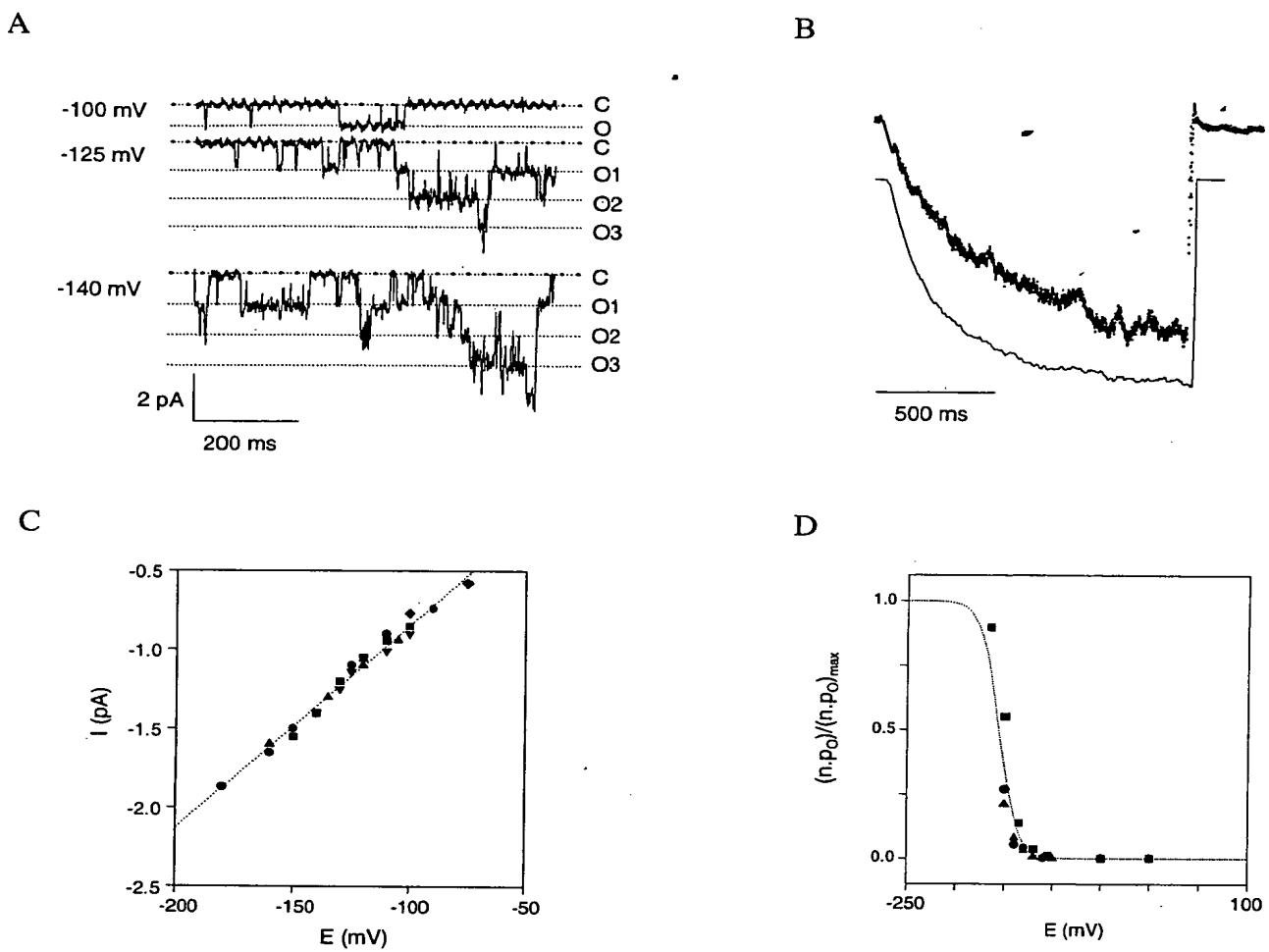


Figure 5.10 : caractérisation fonctionnelle de SIRK dans l'ovocyte de xénopé par la méthode du patch-clamp: analyse des courants unitaires.

Les ovocytes ont reçu une injection de 10 ng d'ARNc SIRK 2 à 7 jours avant les enregistrements, réalisés en patch-clamp mode "cellule-attachée". Les solutions de bain et de pipette contiennent : KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, HEPES-NaOH 10 mM (pH 7,5).

**A.** Courants unitaires enregistrés en réponse à une hyperpolarisation de la membrane (-100, -125 et -140 mV). Trois canaux au moins sont présents dans ce patch (C : canal fermé; O1, O2, et O3 : un, deux ou trois canaux ouverts, respectivement. Les détails de l'analyse des données pour la détermination des niveaux C, O1, O2 et O3 sont décrits dans le chapitre 4, § 4.3.2).

**B.** Comparaison des cinétiques d'activation de SIRK obtenues en voltage-clamp à deux électrodes et en patch-clamp. La trace supérieure correspond à la sommation de 200 épisodes (de 1,5 s chacun) à -140 mV. La courbe (trace inférieure) est le courant macroscopique normalisé enregistré à -140 mV en voltage-clamp à deux électrodes.

**C.** Courants unitaires représentés en fonction du potentiel imposé. Les amplitudes de courant sont obtenues à l'aide des histogrammes d'amplitude (§ 4.3.2). Chaque symbole correspond à un patch différent (n=5). La courbe en pointillés correspond à un ajustement linéaire permettant d'estimer ainsi la conductance unitaire : 13 pS dans 100 mmol.l<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup> externe.

**D.** Sensibilité au voltage du canal SIRK, déterminée à partir des valeurs de n.p<sub>o</sub>. Les valeurs de n.p<sub>o</sub> ont été déterminées en fonction des voltages imposés pour les différents enregistrements (patches) analysés sur le panneau C, et normalisées par rapport à (n.p<sub>o</sub>)<sub>max</sub> (Cf. chapitre 2.8). Un ajustement par une fonction de Boltzman a été réalisé, à l'aide de l'équation :

$$n.p_0 = n.p_{0\max} / (1 + e^{(z_a F(E - E_{a50}) / RT)})$$

où trois paramètres sont ajustés : n.p<sub>0max</sub>, z<sub>a</sub> et E<sub>a50</sub>.

patch, et de comparer ces valeurs avec celles obtenues par la méthode du voltage-clamp à deux électrodes (*Cf.* figure 5.6D). Les valeurs présentées ont été divisées par la valeur de  $n.p_{0\max}$  afin d'obtenir des données comprises entre 0 et 1, c'est-à-dire de pouvoir compiler des données provenant de plusieurs patches, dans lesquels le nombre de canaux peut être variable (pour les détails, voir la légende de la figure 5.10D). Les valeurs obtenues sont ajustées par une fonction de Boltzman, en utilisant les deux paramètres  $E_{a50}$  et  $z_a$  pour rendre compte de la sensibilité du canal au voltage. Les valeurs affectées à ces deux paramètres pour obtenir l'ajustement présenté sur la figure 5.10D sont similaires à celles déterminées par la méthode de voltage-clamp à deux électrodes.

## 5.4 Analyse de l'expression de *SIRK* par RT-PCR

### 5.4.1 Localisation de l'expression

L'expression de *SIRK* a déjà été localisée dans les feuilles (*Cf.* § 5.2). Nous avons recherché si ce gène s'exprime également dans d'autres organes (tiges, racines, jeunes rafles) et dans les baies. Cette étude a été réalisée à différents stades de développement, en utilisant du matériel prélevé aux 3 mêmes stades de développement que ceux utilisés pour la localisation de l'expression de *SOR* : jeunes baies vertes, baies à véraison, et baies en cours de maturation.

De même que pour la recherche de la localisation de l'expression du gène *SOR*, nous avions envisagé d'étudier la localisation de l'expression de *SIRK* par Northern blot. Cependant, nous n'avons pas obtenu, là encore, de signal d'hybridation. Cette absence de signal n'est pas surprenante puisque que le gène *SIRK* semble faiblement exprimé.

Nous avons donc procédé à de nouvelles expériences de RT-PCR. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 5.11. *SIRK* a le même profil d'expression que *SOR* : on le retrouve dans tous les organes testés, à l'exception des racines. Du fait de la mauvaise qualité des préparations d'ARN de racines (*Cf.* chapitre 4, § 4.4), l'absence de détection de transcrits *SIRK* dans ces préparations ne permet pas de conclure à la non-expression de ce gène dans les racines.

### 5.4.2 Aspects quantitatifs de l'expression de *SIRK*

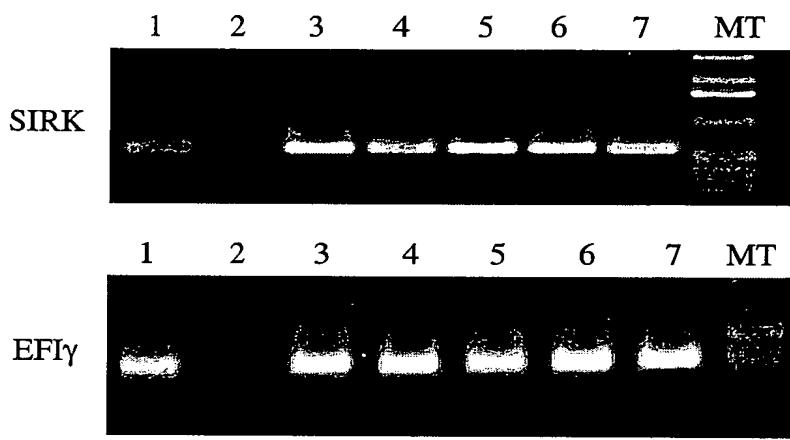


Figure 5.11 : localisation de l'expression de *SIRK* par RT-PCR.

Dix µg d'ARN totaux ont été rétro-transcrits, et 1 µl de la réaction a servi de matrice pour la PCR. 1: rafles (avant la véraison); 2 : racines; 3 : tiges; 4 : jeunes feuilles; 5: jeunes baies (récoltées 30 j avant véraison); 6 : baies à véraison; 7 : baies en cours de maturation (densité des baies de 150-180 g.l<sup>-1</sup>). Le gel du haut correspond à l'analyse des produits de PCR obtenus avec des amores spécifiques de *SIRK*. Le gel du bas présente les produits amplifiés avec des amores spécifique d'*EF1γ*. La RT-PCR d'*EF1γ* constitue le témoin positif de réaction.

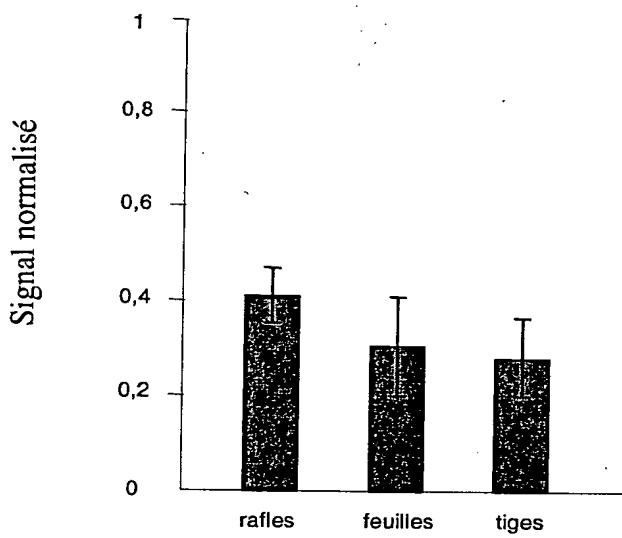


Figure 5.12 : quantification de l'expression de *SIRK* dans les organes végétatifs par RT-PCR quantitative.

Dix µg d'ARN totaux ont été rétro-transcrits. Un µl de la réaction a servi de matrice pour la réaction de PCR réalisée dans des conditions quantitatives (*Cf. texte, § 4.5.1*). La quantification se fait par rapport au standard interne : le facteur d'elongation EF1 $\gamma$ . Moyenne et écart-type de 3 expériences.

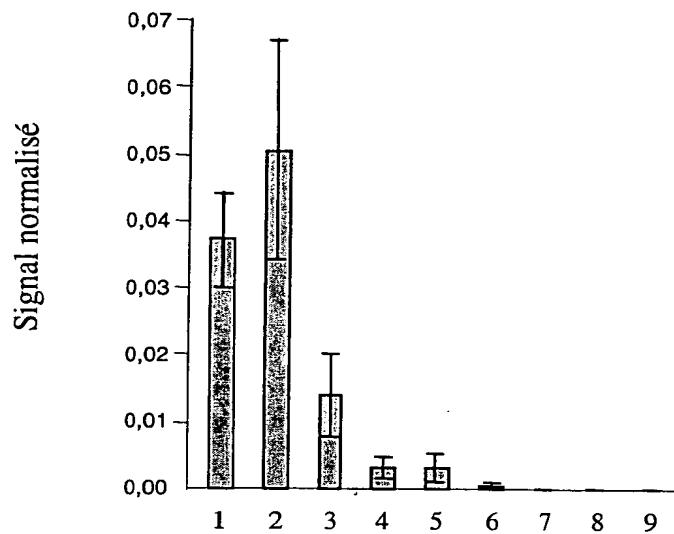


Figure 5.13 : quantification par RT-PCR quantitative de l'expression de *SIRK* dans les baies au cours du développement.

Les analyses concernent des baies récoltées aux stades suivants : 1 : 30 j avant véraison; 2 : 8 j avant véraison; 3 : véraison; 4 : 10-20 % des baies colorées; 5 : 30-50 % des baies colorées; 6 : baies de densité de 150 à 180 g.l<sup>-1</sup>; 7 : 100 % des baies colorées; 8 : baies de densité 180 à 220 g.l<sup>-1</sup>; 9: baies de densité de 220 à 250 g.l<sup>-1</sup>. Définition des stades de développement : Cf. chapitre 4, tableau 4.2. Protocole expérimental: Cf. texte, § 5.4.1. Moyenne et écart-type de 3 expériences.

### *Quantification de l'expression de SIRK dans les parties végétatives*

Nous avons également procédé à une approche quantitative par RT-PCR, afin d'estimer les niveaux d'expression du gène *SIRK* dans les différents organes verts. Le principe est identique à celui décrit pour *SOR* au § 4.4, avec comme référence le gène constitutif *EF1γ*. Il ressort des analyses effectuées que les quantités relatives d'ADNc amplifiées dans les feuilles, les tiges et les rafles sont équivalentes (rapport *SIRK/EF1γ* de 0,3 à 0,4, figure 5.12). Si l'on compare les valeurs des rapports *SOR/EF1γ* (*Cf.* chapitre 4, § 4.4) et *SIRK/EF1γ*, on note une différence d'un facteur 20 environ. Ce point suggère que le transcript *SIRK* est moins abondant que le transcript *SOR* dans les parties végétatives.

### *Quantification de l'expression de SIRK au cours du développement de la baie*

Cette analyse a été menée de la même manière que pour l'étude de *SOR* au § 4.4. Les 9 mêmes stades de développement ont été étudiés (*Cf.* tableau 4.2, chapitre 4). L'ADNc *SIRK* est amplifié de manière importante dans les deux stades précédant la véraison (figure 5.13). Au contraire, dès la véraison, la quantité relative d'ADNc chute de manière brutale. Dès que la moitié des baies d'une grappe a changé de coloration, l'expression disparaît. Chez les baies matures, l'ARNm *SIRK* n'est plus détecté. Les valeurs de rapport *SIRK/EF1γ* sont de l'ordre de  $10^{-2}$  et inférieures à celles obtenues dans les parties végétatives (*Cf.* § précédent), ce qui suggère que la quantité de transcrits *SIRK* est très faible dans les baies.

Ces résultats peuvent paraître contradictoires par rapport aux données obtenues par RT-PCR classique (amplification de l'ADNc *SIRK* au stade de densité 150-180 g.l<sup>-1</sup>. *Cf.* figure 5.11). Cependant, celles-ci ont été obtenues dans des conditions non quantitatives : un ADNc, présent en quantité infime à ce stade de maturation, sera amplifié de manière si importante (35 cycles = amplification d'un facteur 10 milliards) que l'on ne pourra pas faire de distinction par rapport à un ADNc présent au départ en plus grande quantité (stade herbacé). En revanche, la PCR quantitative met en œuvre un plus petit nombre d'amplifications, ce qui permet de préserver les différences d'abondance.

## **5.5 Localisation de l'expression de *SIRK* par utilisation du gène rapporteur *GUS***

Le fait de disposer du promoteur du gène *SIRK* a permis la construction d'un système rapporteur de la localisation de l'expression du gène *SIRK*. Nous avons fusionné les 3 kpb proximaux du promoteur *SIRK* à l'ADNc *GUS*, de manière à exprimer la β-glucuronidase sous le contrôle de cette région.

Cette construction a été clonée dans un vecteur binaire (pBIB-Hygro, Cf. chapitre 2, § 2.6.1), permettant son transfert dans des agrobactéries, puis dans les plantes. Nous avons exprimé la construction en système homologue, par transformation de cals embryogènes de vigne, et en parallèle en système hétérologue chez *Arabidopsis*. Les résultats étant plus rapides à obtenir chez *Arabidopsis*, ils pouvaient nous fournir une première indication sur la localisation de l'expression de *SIRK*.

### **5.5.1 Etude en système hétérologue**

Des plantes sauvages d'*Arabidopsis*, d'écotype Columbia et WS, ont été transformées par la fusion promoteur *SIRK:GUS*, selon la méthode d'infiltration des fleurs (Bechtold *et al.*, 1993) adaptée par Clough et Bent (1998) (Cf. chapitre 2, § 2.6.4). Les graines issues des plantes ainsi traitées sont rendues axéniques et semées sur du milieu MS/2 additionné d'hygromycine, de manière à sélectionner les lignées transgéniques.

Les analyses ont été réalisées sur des transformants primaires et leurs descendants de seconde génération. Pour les deux écotypes, 10 lignées transgéniques indépendantes, de deuxième génération, ont été étudiées. Les plantes analysées ont été cultivées *in vitro*, ou sur du terreau en serre. Les profils d'expression obtenus ont été très semblables dans les deux conditions. L'activité GUS est révélée par une coloration histochimique se traduisant par la formation d'un composé bleu insoluble (Cf. chapitre 2, § 2.7). Après coloration, les plantules ou les organes sont observés à la loupe binoculaire, puis au microscope. Pour préciser la localisation au niveau cellulaire, les organes ont été inclus dans de l'agarose 4 %, puis découpés au Vibracut, et observés au microscope.

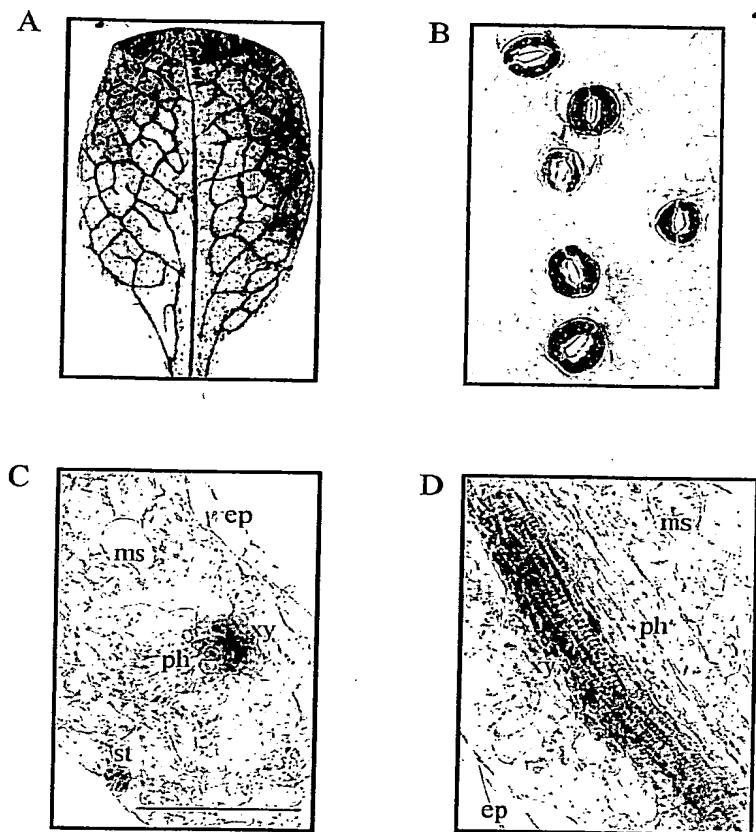


Figure 5.14 : expression du gène rapporteur *GUS* sous contrôle de la région promotrice de *SIRK* chez *Arabidopsis*.

L'activité GUS des plantes transgéniques est révélée par coloration histochimique. Les plantes ont été cultivées en terre.

**A** : feuille mature.

**B** : stomates d'une feuille mature.

**C** : coupe transversale de feuille mature.

**D** : coupe longitudinale de feuille mature.

Ep : épiderme, ms : mésophylle, ph : phloème, st : stomate, xy : xylème.

Barre = 30 µm.

### *Observations sur plantes entières*

Les observations menées sur les plantules de première et deuxième génération cultivées *in vitro* révèlent la présence pour chaque lignée de la coloration bleue dans les cellules de garde des feuilles et des tiges. La coloration se retrouve également au niveau des vaisseaux conducteurs des feuilles, de manière variable : nervures principales des cotylédons, des pétioles cotylédonnaires et de l'hypocotyle; nervures secondaires et parfois nervures principales; nervure centrale uniquement; voire aucune nervure dans certains cas pour les jeunes feuilles.

Les plantes cultivées en terre présentent également une coloration intense dans les cellules de garde (figure 5.14B) des feuilles et des tiges. La coloration des tissus conducteurs foliaires est plus homogène dans les lignées de deuxième génération : la nervure centrale et les veines majeures sont colorées dans la majorité des cas (figure 5.14A).

L'analyse d'*Arabidopsis* transgéniques exprimant le gène *GUS* sous le contrôle du promoteur *KAT2* indique que *KAT2* est aussi exprimé dans les tissus conducteurs des feuilles et les cellules de garde (Pilot, 1999). Cependant, il semble y avoir dans ce cas une coloration bleue préférentiellement dans les cellules de garde des tiges et des pétioles. En revanche, nous avons observé que *SIRK* est exprimé de manière équivalente dans les cellules de garde des feuilles, des tiges et des pétioles.

### *Observations en coupe*

Les coupes de feuilles montrent que la coloration observée au niveau des tissus vasculaires est localisée au pôle xylémien (figure 5.14C et D). Ce résultat est intéressant, puisqu'il a été montré au laboratoire que *KAT2* est exprimé au niveau des tissus conducteurs (Pilot, 1999). Les analyses en système homologue permettront de savoir s'il s'agit d'un artefact lié au système d'expression ou d'une réelle différence de localisation de l'expression.

#### **5.5.2 Etude en système homologue**

La transformation de la vigne est un processus long et délicat, puisqu'il faut transformer des cals embryogènes, et les amener à régénérer des plantules qui ont intégré la construction transgénique. La transformation de cals embryogènes se fait à l'aide d'agrobactéries elles-mêmes transformées par le plasmide d'intérêt. Les cals sont maintenus sur un milieu sélectif

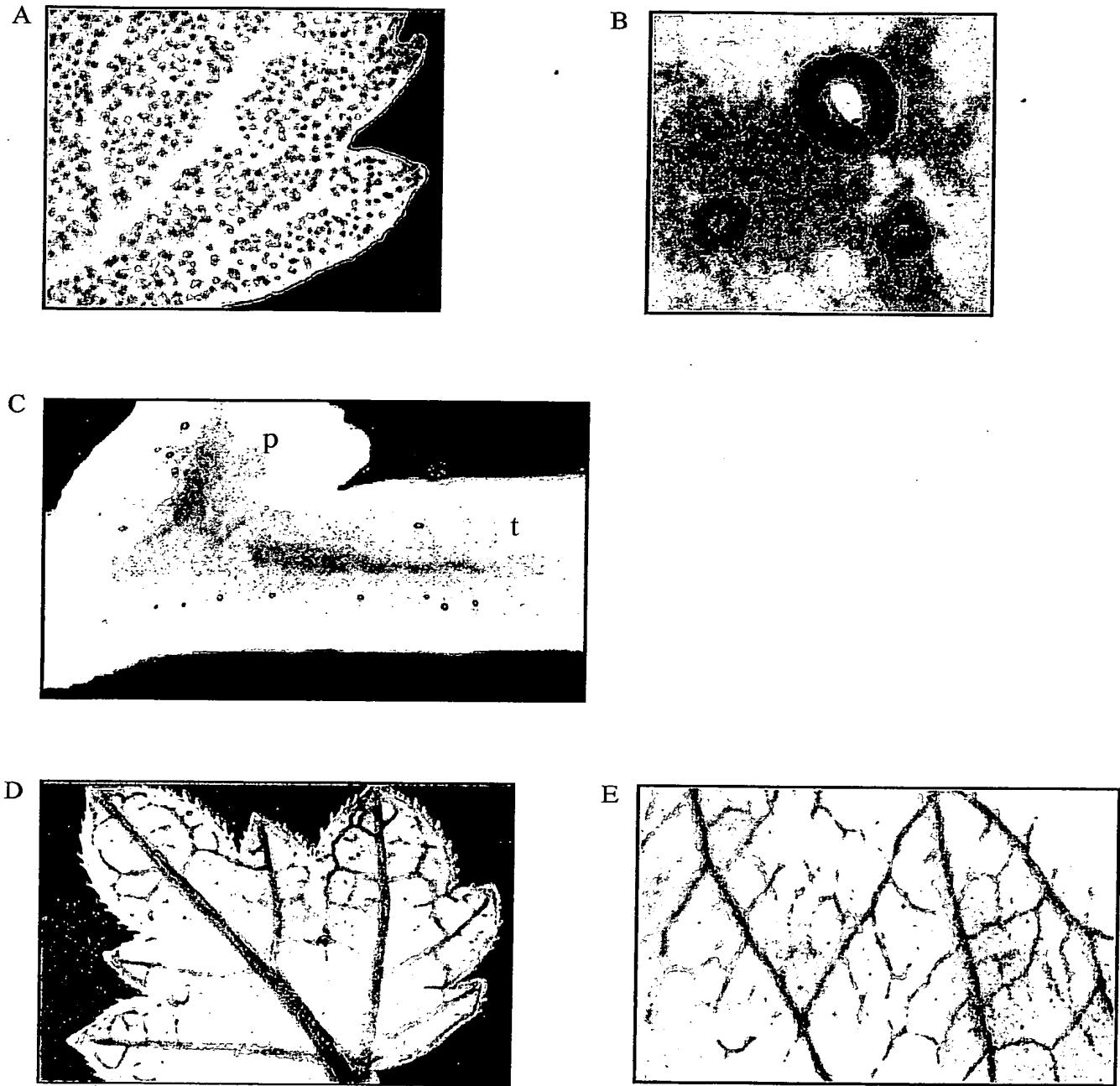


Figure 5.15 : localisation de l'activité de la région promotrice du gène *SIRK* chez *Vitis vinifera*, cv Portan.

L'activité GUS des plantes transgéniques exprimant l'ADNc *GUS* sous le contrôle des promoteurs *SIRK* ou 35S est révélée par coloration histochimique. Les plantes analysées étaient agées de 8 semaines (environ 4 feuilles). Elles ont été cultivées *in vitro*.

- A. Localisation de l'expression de *SIRK*. Détail d'une feuille.
- B. Détail de la photo A : la coloration bleue est spécifique des cellules de garde.
- C. Localisation de l'expression de *SIRK* dans une tige (t) et dans un pétiole (p).
- D. Feuille d'une plante transformée avec la construction témoin promoteur 35S:*GUS*.
- E. Expression de la construction 35S:*GUS* : détail d'une feuille.

où ils croissent et se différencient, jusqu'à former des embryons, puis des plantules (*Cf.* chapitre 2, § 2.6.5). Cela prend en général un an. Lorsque les plantules ont assez poussé, il est possible de vérifier l'insertion du transgène par PCR sur ADN génomique, puis de rechercher la coloration bleue, reflet de l'activité glucuronidase. Nous avons choisi comme témoin positif de transformation et d'expression une construction promoteur 35S:*GUS*.

Nous avons obtenu 13 événements indépendants de transformation par la construction promoteur *SIRK:GUS*, et 7 pour la construction promoteur 35S:*GUS*. Après fixation des tissus et mise au contact du substrat de la  $\beta$ -glucuronidase, nous avons constaté que le promoteur *SIRK* ne dirige l'expression de l'ADNc *GUS* que dans les cellules de garde des feuilles, pétioles et tiges (figure 5.15 A à C). Les autres parties de la plante ne sont pas colorées (non montré). Par rapport à l'expression de la même construction dans *Arabidopsis*, il n'y a donc pas de coloration des tissus conducteurs. Cette absence de coloration ne résulte pas de problèmes de diffusion du substrat, qui ne parviendrait pas jusqu'aux tissus conducteurs chez la vigne, puisque l'analyse des plantes ayant intégré la construction promoteur 35S:*GUS*, traitées en même temps et de la même manière, révèle une coloration de ces tissus (figure 5.15 D et E). Il est donc probable que la coloration du xylème chez *Arabidopsis* soit artéfactuelle, ce qui expliquerait l'hétérogénéité des profils de coloration observés alors (*Cf.* § 5.5.1).

Le deuxième point inattendu de ces analyses est le profil de coloration présenté par les plantes transformées par la construction promoteur 35S:*GUS*. Ce promoteur étant fort et constitutif, on pourrait s'attendre à ce que la feuille entière soit colorée. Cependant seules les nervures sont colorées (figure 5.15D). Dans les autres organes testés (racines, tiges), la coloration bleue est intense et ubiquitaire (résultat non montré). Ces résultats sont conformes à ce qui a déjà été observé chez la vigne (Baribault *et al.*, 1990; Berres *et al.*, 1992; Mauro *et al.*, 1995), suggérant que le promoteur 35S n'est pas complètement constitutif chez cette espèce.

## 5.6 Discussion

### 5.6.1 Analyse des séquences

#### *Séquence protéique*

La comparaison de la séquence protéique de SIRK avec celles des différents canaux potassiques de type Shaker d'*Arabidopsis* montre que cette protéine appartient au sous-groupe KAT (groupe II), et révèle, comme pour SOR et de nombreuses enzymes clonées chez la vigne, une forte conservation au cours des spéciations. En effet, SIRK présente 56 % d'identité avec KAT1, et 70 % d'identité avec KAT2. A l'exception du domaine R5, il est rare de trouver des zones des protéines SIRK et KAT2 présentant des différences marquées.

Le domaine R5 est donc le siège principal des 30 % de divergence entre SIRK et KAT2. SIRK possède une particularité unique chez les protéines de type KAT des végétaux : il possède un domaine ankyrine. Historiquement, c'est la présence ou l'absence d'un domaine ankyrine qui a servi de base à la première classification des canaux potassiques végétaux : les canaux de type AKT possèdent un domaine ankyrine, mais pas les canaux KAT (les propriétés fonctionnelles des canaux diffèrent peu à l'intérieur de chaque sous-groupe). La découverte des canaux sortants SKOR et SKOR2 a remis en cause cette classification, car ils possèdent eux aussi un domaine ankyrine, et sont relativement divergents des canaux AKT, tant au niveau de leur séquence protéique que de leur structure génique et surtout de leurs propriétés fonctionnelles. Aujourd'hui, SIRK montre que même un canal de type KAT peut posséder un domaine ankyrine.

Le domaine ankyrine de SIRK est cependant particulier. Il est de taille beaucoup plus restreinte que celui des canaux de type AKT et SKOR, car il ne comporte que deux demi-motifs ankyrine encadrant un motif complet. AKT2 possède 5 répétitions complètes du motif et le début d'une sixième, tandis que AKT1, AKT5, AKT6, SKOR et SKOR2 possèdent 6 motifs complets (*Cf. chapitre 1, figure 1.3*). Par ailleurs, SIRK présente, en aval du domaine ankyrine, une région d'une cinquantaine d'acides aminés ne présentant aucune similarité avec les canaux potassiques ou les séquences des banques de données. Ce point est à rapprocher du fait que les séquences du domaine R5 de KAT1 et KAT2 ne présentent, elles non plus, aucune similarité avec d'autres protéines connues.

### **Structure génique**

Les séquences des gènes *SIRK*, *KAT1* et *KAT2* ont été comparées. Ces analyses ont révélé une très bonne conservation de la structure génique entre *Vitis* et *Arabidopsis*. Ici encore, *SIRK* est plus proche de *KAT2* que de *KAT1* : les deux gènes possèdent le même nombre d'introns, et notamment les introns 8 et 10 qui sont spécifiques de *KAT2*. De plus, ces introns sont positionnés aux mêmes endroits, au nucléotide près, dans la séquence des deux gènes. La présence du domaine ankyrine supplémentaire ne perturbe pas l'organisation du gène *SIRK* par rapport au gène *KAT2*. L'intron 9 se positionne en amont du début du domaine ankyrine, et ce dernier ne contient ensuite pas d'intron. C'est un fait remarquable car chez les canaux d'*Arabidopsis* possédant un domaine ankyrine, il existe toujours au moins un intron qui interrompt le domaine ankyrine. La première répétition du motif ankyrine présente 1 intron (*AKT1*, *AKT2*, *AKT5*, *AKT6*, *SKOR*, *SKOR2*), la deuxième, 2 introns (mêmes gènes que précédemment), la cinquième 1 intron (*SKOR* et *SKOR2*) et la sixième 1 intron (*SKOR* et *SKOR2*). Il semble donc que le domaine ankyrine de *SIRK* corresponde aux répétitions 3, 4 et 5, ou 4, 5 et 6 des autres canaux. Les répétitions 3 et 4 ne contiennent pas d'intron, et ceux des répétitions 5 et 6 ne sont présents que chez les canaux *SKOR*, et sont situés à la fin du motif ankyrine correspondant. Cette hypothèse est aussi appuyée par le fait que les motifs ankyrine de *SIRK* sont le plus similaires aux répétitions 3 et 4 d'*AKT1*. Ainsi, si l'on admet que l'ancêtre commun des gènes des canaux potassiques possédait un domaine ankyrine (Pilot, 1999), il semble que la perte de ce domaine aboutissant aux canaux de type KAT ait débuté au niveau des premières répétitions, la présence d'introns étant justement favorable à la délétion de séquences. *SIRK* pourrait alors être un intermédiaire évolutif dans la perte du domaine ankyrine, entre les canaux AKT possédant ce domaine, et les canaux KAT en étant totalement dépourvus.

### **Nombre de copies du gène**

L'analyse du nombre de copies du gène *SIRK* dans le génome de la vigne suggère qu'il est unique. Le profil obtenu lorsque l'ADN génomique est hybride à basse stringence par une sonde hétérologue *KAT1/KAT2* (Cf. chapitre 3, figure 3.2) est également en faveur de cette hypothèse. Si l'on considère la représentation des gènes de type *KAT* chez les végétaux, il n'existe à l'heure actuelle qu'un seul gène de type *KAT* chez la pomme de terre (*KST1*), le maïs (*ZmKAT1*; Yan-Hua Su, communication personnelle), et le riz (*OsKAT1*, BAC n° AP002092). Il est bien sûr possible que d'autres représentants des gènes *KAT* soient trouvés

ultérieurement chez ces organismes. Mais *Arabidopsis* est pour l'instant le seul végétal connu comportant deux gènes de type *KAT* (*KAT1* et *KAT2*), ce qui est d'autant plus remarquable que ces deux gènes sont exprimés tous les deux dans les cellules de garde (Nakamura *et al.*, 1995; Pilot, 1999) et que leurs caractéristiques fonctionnelles sont très proches. D'autre part, chez la pomme de terre, c'est *SKT1*, l'orthologue de *AKT1*, qui est exprimé avec *KST1* (l'orthologue de *KAT1*) dans les cellules de garde (Zimmerman *et al.*, 1998), ce qui suggère que *KAT2* n'a pas d'équivalent chez ce végétal. L'expression de deux gènes de type *KAT* dans les cellules de garde pourrait donc ne pas être une solution systématiquement adoptée par les plantes pour contrôler le fonctionnement de leur stomates.

### 5.6.2 Propriétés fonctionnelles de SIRK

Les caractéristiques fonctionnelles de SIRK ont été déterminées par analyse de ce canal dans l'ovocyte de xénope. Il s'agit d'un canal permettant l'influx de K<sup>+</sup> à l'intérieur des cellules, ouvert par l'hyperpolarisation membranaire et donc régulé par le voltage. L'activité du canal SIRK est indépendante du temps (le canal ne présente pas de phénomène d'inactivation), ce qui signifie que, comme les autres canaux de type Shaker chez les plantes, il est impliqué dans des flux soutenus de K<sup>+</sup>. Les différentes données, obtenues par voltage-clamp à deux électrodes ou par patch-clamp, indiquent que les propriétés de SIRK sont très similaires à celles de KAT2. Ce constat n'est pas surprenant. En effet, nous avons vu que les deux protéines partagent 70 % de résidus communs, que les deux gènes correspondants possèdent la même structure, et que, dans un contexte analogue, les canaux SOR et SKOR présentent également des caractéristiques fonctionnelles très proches. En système hétérologue, la présence du petit domaine ankyrine de SIRK ne semble donc pas avoir d'influence détectable sur l'activité du canal. La petite taille de ce domaine laisse toutefois un doute sur sa fonctionnalité.

La ressemblance fonctionnelle entre KAT2 et SIRK est plus grande qu'entre KAT1 et KAT2, qui sont pourtant codés par deux gènes provenant de la duplication relativement tardive (dans l'histoire évolutive de la famille) d'un gène ancêtre (Pilot, 1999). Cela suggère que les deux canaux ont le même rôle chez *Arabidopsis* et chez la vigne, et que l'ajustement précis de leurs paramètres fonctionnels est nécessaire à ce rôle.

Finalement, SIRK, KAT1 et KAT2 partageant des caractéristiques électrophysiologiques très proches, cela implique que SIRK possède les caractéristiques majeures de la conductance potassique entrante des cellules de garde (Ichida *et al.*, 1997; Brüggemann *et al.*, 1999). L'analyse de son expression indique qu'il est effectivement exprimé dans ces cellules. Des études électrophysiologiques sur protoplastes de cellules de garde de vigne pourraient permettre de mieux étudier son fonctionnement *in vivo* et affiner les comparaisons avec les canaux de type KAT d'*Arabidopsis* et de la pomme de terre.

### 5.6.3 Analyse de l'expression de *SIRK*

#### *Localisation de l'expression*

La localisation de l'expression de *SIRK* a été étudiée dans une première étape par RT-PCR. Cela nous a permis de constater que ce gène s'exprime dans les feuilles, les tiges, les jeunes rafles et les baies. Comme pour *SOR*, cette technique ne nous a pas permis de savoir s'il est également exprimé dans les racines, puisque la préparation d'ARN correspondante est problématique (*Cf.* chapitre 4, § 4.4.1).

Dans une seconde étape, nous avons utilisé le promoteur de *SIRK* pour localiser l'expression du gène par une approche de gène rapporteur, en fusionnant ce promoteur avec *GUS*. Ce dernier code la  $\beta$ -glucuronidase, qui catalyse la coupure du substrat (X-Gluc) en un composé qui se dimérisé, et forme un précipité bleu en milieu oxydatif. La construction promoteur:*GUS* a été introduite chez *Arabidopsis* et chez la vigne. La transgénèse de la vigne étant un procédé long et délicat, l'expression en système hétérologue pouvait nous donner une première idée de la localisation de l'expression de *SIRK*.

Ainsi, nous avons pu constater que chez *Arabidopsis*, *SIRK* est exprimé dans les cellules de garde des feuilles, des pétioles et des tiges, et souvent dans les tissus conducteurs, au niveau du xylème. Ce profil est relativement en accord avec les données de RT-PCR, ainsi qu'avec la localisation de l'expression du gène orthologue chez *Arabidopsis*, *KAT2* (Pilot, 1999). Ce dernier est en effet exprimé dans les cellules de garde et dans les tissus conducteurs, mais au niveau du phloème (Pilot, 1999). Par contre, en système homologue chez la vigne, l'expression de la construction promoteur *SIRK*:*GUS* n'est retrouvée qu'au niveau des cellules de garde. Le profil est identique dans toutes les lignées de vignes transgéniques étudiées, l'activité GUS étant systématiquement et uniquement présente dans les cellules de garde. Il semble donc très spécifique. Cela pourrait indiquer que l'expression dans le xylème d'*Arabidopsis* est artéfactuelle et qu'*a priori*, la localisation de l'expression de *SIRK* et de *KAT2* sont partiellement différentes.

#### *Quantification de l'expression de SIRK et rôle de ce gène dans la plante*

Les données préliminaires fournies par les expériences de RT-PCR quantitative indiquent que les quantités de transcript *SIRK* dans les feuilles, les tiges et les rafles sont équivalentes. En revanche, les quantités détectées dans les baies sont inférieures d'un ordre de grandeur. Ce point est sans doute relié au fait que les baies ne comportent qu'une dizaine de

stomates en moyenne, tandis que les feuilles en possèdent environ 220 par cm<sup>2</sup>. La quantification des transcrits *SIRK* au cours du développement des baies révèle un changement marqué du niveau d'accumulation du transcript à la véraison, et les ARN ne sont plus détectables dès que 30 à 50 % des baies d'une grappe sont colorées. Ce gène pourrait donc constituer donc un marqueur moléculaire de la véraison.

Nous avons observé que *SIRK* est exprimé dans les cellules de garde des organes végétatifs. Il est donc possible qu'il soit également exprimé dans les cellules de garde des baies. Cette hypothèse s'appuie également sur l'observation d'une relation apparente, au cours du développement de la baie, entre le niveau d'accumulation du transcript *SIRK* et l'évolution et la dégénérescence des stomates. En effet, avant la véraison, la baie est photosynthétique, ses stomates sont fonctionnels, et elle se comporte comme les organes végétatifs en ce qui concerne ses flux de métabolites et d'eau. A la véraison, elle devient un organe puits, n'est plus photosynthétique, et ses stomates évoluent en lenticelles non fonctionnels. Cette évolution se fait paradoxalement grâce au flux de transpiration, qui permet l'acheminement de calcium et de silicium au niveau de protubérances qui surélèvent les stomates (Blanke, 1999). Ces éléments se combinent aux polyphénols et à la subérine qui s'accumulent eux aussi au niveau des protubérances, ce qui abouti à une obstruction complète du vestibule stomatique (Blanke, 1999). Une hypothèse émise pour expliquer cette évolution serait que l'inactivation des stomates constituerait un moyen pour la baie de réduire les pertes d'eau par transpiration et de maintenir ainsi sa turgescence.

L'ensemble des connaissances acquises sur le gène *SIRK* et son produit révèle une forte conservation des séquences et des propriétés fonctionnelles par rapport au gène *AtKAT2* et au polypeptide qu'il code. L'expression du gène *SIRK* a été localisée dans les cellules de garde. De plus, la caractérisation électrophysiologique de *SIRK* a montré qu'il possède les propriétés des canaux potassiques entrants présents sur la membrane des cellules de garde, identifiés *in vivo* chez les plantes modèles. Ces résultats permettent de définir *SIRK* comme un canal d'influx de K<sup>+</sup> des cellules de garde de vigne, impliqué dans l'ouverture stomatique. Sa présence probable au niveau des stomates de la baie est un point intéressant, puisqu'elle implique un rôle dans les flux de transpiration du fruit, qui sont le moteur de l'apport de solutés, et un moyen de régulation des flux hydriques du fruit.

D'un point de vue technologique, il faut noter que les approches d'étude de localisation d'expression à l'aide de gènes rapporteurs chez la vigne sont rares. La technique de

transgénèse de la vigne est en effet une technologie récente. Les premières transformations de cals par des constructions contenant le gène rapporteur *GUS* (sous contrôle du promoteur 35S) avaient essentiellement pour but de vérifier si la transformation était effective, par visualisation de la coloration bleue dans les tissus (Baribault *et al.*, 1990; Berres *et al.*, 1992; Torregrossa, 1994; Mauro *et al.*, 1995). D'autre part, il existe peu de promoteurs clonés et étudiés de façon approfondie chez la vigne. Ainsi, à notre connaissance, les travaux présentés dans cette thèse sont les premiers qui utilisent l'outil "transgénèse de la vigne" dans le but d'étudier la localisation de l'expression d'un gène. Les résultats obtenus sont encourageants, dans la mesure où ils sont spécifiques et reproductibles (*Cf.* chapitre 5, § 5.5.2). Cela permet d'envisager à relativement court terme l'utilisation en routine des gènes rapporteurs pour localiser systématiquement l'expression de gènes d'intérêt chez la vigne, au niveau tissulaire et au cours du développement. Nous sommes d'ailleurs actuellement en train de tester une construction couplant le promoteur *SIRK* à la GFP, qui pourrait permettre des analyses non destructrices des plantes, et donc le suivi en continu des variations de l'expression du gène au cours du développement.

## Chapitre 6

### Conclusions et perspectives

#### **Cadre général du programme**

Un large ensemble de données agronomiques et physiologiques révèlent, en vignoble à vin, des corrélations négatives entre la disponibilité de  $K^+$  dans le sol, la capacité de prélèvement de cet ion, son accumulation dans la baie d'une part, et l'acidité et la qualité du moût d'autre part. Des traitements œnologiques existent pour pallier un déficit d'acidité de la vendange. Cependant, ces solutions sont insatisfaisantes, et la législation tend à restreindre leur application. Il serait donc souhaitable de disposer de cultivars fournissant des moûts suffisamment acides même dans des sols relativement riches en  $K^+$ . Il s'agit là d'une demande récurrente de la profession viti-vinicole, en particulier dans les régions méditerranéennes. Mes recherches s'inscrivent dans ce contexte. Dans la pratique, ce mémoire présente la première étude moléculaire des mécanismes de transport de  $K^+$  chez la vigne.

Il est clair, compte tenu du contexte général, que deux objectifs doivent être assignés aux recherches de ce type. Bien évidemment, le premier est d'acquérir des connaissances fondamentales sur les mécanismes de transport de  $K^+$  chez la vigne, de façon à faciliter le travail des sélectionneurs. Le second objectif s'inscrit davantage dans une démarche de recherche finalisée : utiliser le génie génétique pour perturber les flux de  $K^+$  dans la plante, afin d'obtenir des plantes "outils" permettant d'analyser les effets de ces modifications sur la teneur en  $K^+$  de la baie, son acidité et sa qualité, par rapport à la vinification. Au terme de cette thèse, je ferai le bilan des résultats obtenus par rapport à ces deux objectifs.

#### **Analyse des déterminants moléculaires du transport de $K^+$ chez la vigne : identification de deux canaux potassiques**

Au démarrage de ce programme, nous avons pensé qu'il était judicieux de prendre comme cible la famille des canaux potassiques de type Shaker, de façon à bénéficier des connaissances concernant ces protéines chez l'espèce modèle *Arabidopsis*. En effet, les canaux Shaker sont les systèmes de transport de  $K^+$  les mieux caractérisés chez *Arabidopsis*, et chez les plantes en général. Chez *Arabidopsis*, un ensemble d'approches convergentes, utilisant les outils de la biologie moléculaire, de l'électrophysiologie, de la biochimie et de la

génétique inverse, a permis de révéler que ces protéines jouent un rôle déterminant dans la fonction de prélèvement de K<sup>+</sup> par la racine (Lagarde *et al.*, 1996; Hirsch *et al.*, 1998), la sécrétion de cet ion dans la sève xylémienne en direction des parties aériennes (Gaymard *et al.*, 1998), la remobilisation et la redistribution dans la plante via la sève phloémienne (Lacombe *et al.*, 2000), et les flux de K<sup>+</sup> dans la cellule de garde (Schachtman *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1995; Pilot *et al.*, soumis). Le criblage de banques d'ADN génomique et d'ADN complémentaire à l'aide de sondes nucléotidiques correspondant à des régions conservées des canaux d'*Arabidopsis* nous a permis d'identifier deux canaux de vigne, que nous avons appelés VvSOR (pour Shaker Outward Rectifying channel) et VvSIRK (pour Stomatal Inward Rectifying K<sup>+</sup> channel).

Le canal SOR est un homologue des canaux SKOR et SKOR2 d'*Arabidopsis*. Nous n'avons pas pu caractériser un clone génomique complet pour ce canal. En effet, les criblages initiaux ont fourni un gène apparenté mais inactivé depuis longtemps par l'insertion d'un transposon, et le dernier criblage effectué a permis d'identifier un clone probablement complet, mais que nous n'avons pas eu le temps de caractériser. Des données préliminaires concernant la structure du gène *SOR* ont cependant pu être obtenues par PCR. Elles suggèrent que *SOR* est l'orthologue de *SKOR2*. L'expression de l'ADNc complet *SOR* dans des ovocytes de xénope a révélé que le canal SOR partage les caractéristiques essentielles de SKOR2 (et SKOR) : sensibilité au voltage et rectification sortante, sensibilité au pH interne et externe, activation par K<sup>+</sup> sur la face externe de la membrane. L'analyse de l'expression de *SOR* par RT-PCR indique que ce canal est exprimé dans les parties aériennes, comme *SKOR2*, et à la différence de *SKOR*, qui n'est exprimé que dans la racine. En relation avec l'objectif finalisé de ce travail, *i.e.* la compréhension des mécanismes déterminant la teneur de la baie en K<sup>+</sup>, nous avons estimé par PCR semi-quantitative le niveau des transcrits *SOR* dans la baie tout au long du développement de cet organe. Les données obtenues suggèrent que le transcrit *SOR* est peu abondant, que son niveau d'accumulation relative semble diminuer au cours du développement de la baie mais qu'il reste toujours détectable (au contraire du transcrit *SIRK*, Cf. ci-dessous). Sur la base de l'ensemble de ces données, notre hypothèse est que *SOR* est exprimé sur la membrane des cellules de garde des stomates, des feuilles mais aussi de la baie. Il constituerait la conductance potassique sortante permettant l'efflux de K<sup>+</sup> de la cellule de garde et la fermeture stomatique. Les observations indiquant que le transcrit *SOR* est nettement plus abondant que le transcrit *SIRK* (Cf. ci-dessous, par comparaison dans les deux cas avec le transcrit *EF1γ*. Cf. figures 4.11, 4.12, 5.12 et 5.13) et qu'il reste détectable dans les préparations d'ARN de baies prélevées à des stades où les stomates de ces organes ont dégénéré, suggèrent que l'expression de ce gène concerne, outre les stomates, d'autres tissus de la baie. Une expression dans les tissus conducteurs phloémiens, en relation avec un rôle dans la décharge de K<sup>+</sup> dans la baie, ferait de SOR une cible privilégiée pour la poursuite de ce programme. Nous avons déjà mis en place une approche de type génétique inverse, reposant

sur la surexpression d'un canal SOR mutant dominant négatif (obtenu par mutagénèse dirigée; Cf. figure 6.1) dans des vignes transgéniques, dans le but d'obtenir des informations concernant le rôle de ce canal dans la plante (Cf. ci-dessous). En appui à ce travail, il serait maintenant urgent de préciser le profil d'expression de *SOR*, à l'aide de vignes transgéniques exprimant un gène rapporteur.

Le deuxième canal de vigne identifié au cours de cette étude est codé par le gène *SIRK*. Les analyses par RT-PCR indiquent que ce gène est exprimé dans les parties végétatives aériennes et dans les baies. L'abondance des transcrits est faible. La structure du gène et sa traduction en acides aminés indiquent que *SIRK* est l'orthologue du gène *KAT2* d'*Arabidopsis*. Le canal *SIRK* est doté des mêmes caractéristiques fonctionnelles que le canal *KAT2*, lorsqu'ils sont exprimés dans l'ovocyte de xénope : activation lente, rectification entrante, sensibilité au pH interne et externe. La confrontation des données d'électrophysiologie et de localisation de l'expression par RT-PCR suggère que le canal *SIRK* est un canal d'influx de la membrane des cellules de garde. Cette hypothèse est confirmée, dans les parties végétatives, par l'analyse de vignes transgéniques exprimant le gène rapporteur *GUS* sous le contrôle du promoteur *SIRK*. Ce profil d'expression, restreint aux cellules de garde, pourrait expliquer la faible abondance du transcrit *SIRK* dans les extraits globaux d'ARNm. Les données de RT-PCR semi-quantitatives sur des lots d'ARN correspondant à divers stades de développement des baies indiquent que le transcrit *SIRK* disparaît brutalement après la véraison, ce qui correspond au moment où les stomates de la baie évoluent en lenticelles non fonctionnels. Cela suggère que, dans la baie, *SIRK* est exprimé uniquement dans les cellules de garde. En participant à la régulation de la transpiration via son expression dans les stomates, *SIRK* pourrait jouer un rôle dans le contrôle du flux de K<sup>+</sup> arrivant dans les parties aériennes via la sève xylémienne, et dans la baie tant que cet organe présente des stomates et un xylème fonctionnels. Par ailleurs, le profil d'expression du gène rapporteur chimérique promoteur *SIRK:GUS*, restreint aux stomates, désigne la région promotrice de *SIRK* comme une séquence privilégiée, dans des stratégies de lutte contre des champignons pathogènes (tels le mildiou) utilisant les stomates pour pénétrer dans les tissus de la plante. Cette séquence pourrait permettre de cibler l'expression de transgènes (protéine antifongique : e.g. chitinase, inhibiteur de sporulation) au niveau des stomates.

Outre leur intérêt dans le cadre de l'analyse des déterminants du transport de K<sup>+</sup> chez la vigne, les résultats que nous avons obtenus apportent des données originales concernant la famille Shaker chez les plantes. Nous avons constaté que les deux canaux clonés chez la vigne sont très proches de leur équivalent chez *Arabidopsis*, sur les plans protéique, structure génique, et fonctionnel. C'est également le cas des canaux de type Shaker clonés à ce jour chez d'autres plantes. L'analyse de leur séquence protéique permet de construire un arbre phylogénique qui se superpose à celui obtenu à partir des seules séquences d'*Arabidopsis* (Cf. chapitre 1, figures 1.4 et 1.5). Il y a conservation des cinq sous-groupes (AKT, KAT, SKOR,

AKT2, AtKC), avec une légère "fusion" des groupes AKT et KAT (Cf. chapitre 1). De plus, certains canaux proviennent de monocotylédones, et leur séquence protéique s'inscrit quand même dans le schéma global des 5 sous-groupes. La structure des canaux potassiques a donc probablement été fixée avant la séparation des monocotylédones et des dicotylédones. La conservation de la structure génique au sein de cette famille est plus difficile à discuter, car mis à part les gènes clonés chez *Arabidopsis*, les seuls gènes complets dont on dispose sont ceux de *SIRK* et d'*OsKAT1*. Cependant, la structure de ces deux gènes correspond au nucléotide près à la structure génique de *KAT2*. Même l'addition d'un petit domaine ankyrine chez *SIRK* (qu'*OsKAT1* ne possède pas) ne modifie pas la position et le nombre des introns par rapport à *KAT2*. Ces données suggèrent que l'évolution de cette famille multigénique est très ancienne, puisque les mêmes structures géniques se retrouvent chez des espèces très variées, et que la pression de sélection qui s'est exercée depuis la divergence des espèces a été assez forte pour conserver gènes et protéines avec un minimum de dérive. Cette tendance évolutive n'est pas courante chez les familles multigéniques.

### **Expression de canaux mutants dominants négatifs : élucidation du rôle des canaux dans la plante et analyse des effets d'une perturbation des transports de K<sup>+</sup> sur la physiologie de la baie**

La génétique inverse, essentiellement basée sur l'inactivation de gènes, peut offrir une voie commode pour élucider le rôle d'une protéine donnée dans un organisme. Chez les plantes, l'absence de recombinaison complique l'utilisation de cette approche. Chez *Arabidopsis*, les programmes internationaux d'inactivation de gènes par insertion d'ADN-T ou transposons ont permis de pallier cette difficulté. Pour les autres plantes, plus complexes, et n'ayant donc pas le statut de plantes modèles, la détermination du rôle d'une protéine par des approches génétiques est malaisée et dépend beaucoup des caractéristiques de la protéine en question.

Les canaux de type Shaker sont fonctionnels sous forme tétramérique, et l'assemblage de polypeptides mutants non fonctionnels avec des polypeptides fonctionnels peut conduire à la formation de canaux inactifs (Baizabal-Aguirre *et al.*, 1999). De telles sous-unités non fonctionnelles ont donc un comportement de type "mutant dominant négatif". Nous avons pensé qu'il était possible de tirer parti de cette propriété pour développer une analyse de type génétique inverse afin de déterminer le rôle des canaux Shaker chez la vigne. Nous avons choisi le canal SOR comme première cible pour tester cette possibilité d'approche.

Le motif GYGD du pore des canaux est l'élément essentiel du canal, contrôlant le transit des ions K<sup>+</sup>. Ce motif est positionné au fond d'une "bouche" (figure 6.1A), représentée en forme d'entonnoir, canalisant les ions vers le pore. Il est donc positionné dans un

environnement stérique restreint, et des mutations amenant des acides aminés de taille supérieure aux résidus normaux altèrent les propriétés de conduction du pore. Il a ainsi été remarqué au Laboratoire que le remplacement du dipeptide GY par RR rend le canal non fonctionnel (I. Dreyer, communication personnelle). Nous avons décidé de muter l'ADNc *SOR* de manière à reproduire ce changement d'acides aminés (figure 6.1B). L'ADNc muté a ensuite été injecté dans des ovocytes de xénope, seul ou avec l'ADNc sauvage. Les analyses électrophysiologiques (figure 6.1C; travail effectué par Benoît Lacombe) ont confirmé que le polypeptide codé par l'ADNc muté est effectivement doté d'une activité de type "mutant dominant négatif".

Nous avons alors entrepris de transformer des cals embryogènes avec l'ADNc *SOR* mutant dominant négatif. Pour cela, nous avons placé l'ADNc muté sous le contrôle du promoteur 35S, dans le vecteur pBIB-Hygro (*Cf.* chapitre 2, § 2.6.2). Nous avons également transformé des cals avec le vecteur vide et avec l'ADNc sauvage sous contrôle du promoteur 35S, de manière à disposer de plantes contrôles. Des résultats sur le comportement de ces trois types de plantes transgéniques ont été obtenus à la fin de la rédaction de ce mémoire. Ils sont résumés ci-dessous.

Lorsque nous avons procédé à la régénération de plantules à partir de tiges axillaires provenant de cals transformés par les constructions précédemment décrites, nous avons pu constater un léger retard de croissance des individus ayant intégré l'ADNc *SOR* muté par rapport aux deux autres populations. Afin de mettre en évidence un phénotype de ces mutants, nous avons transféré des microboutures des trois sortes de plantes sur un milieu pauvre en K<sup>+</sup>. Ce milieu contient 1 mmol.l<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup> environ. Des microboutures provenant des mêmes plantes ont également été transférées sur milieu MS/2 (K<sup>+</sup> 4 mM environ), de manière à fournir des témoins de croissance. Au bout de trois semaines de culture, les observations indiquent que sur milieu MS/2, les mutants dominants négatifs présentent un léger retard de croissance, par rapport aux boutures exprimant l'ADNc sauvage ou contenant le vecteur vide, rappelant le retard observé lors de la régénération des plantules. Sur milieu "pauvre" en K<sup>+</sup>, les mutants présentent une croissance très réduite (ou ne poussent pas), mais sans nécrose. Les boutures contenant le vecteur vide poussent normalement. Celles qui surexpriment l'ADNc sauvage poussent également normalement, mais présentent un aspect altéré par rapport aux précédentes, avec des feuilles moins bien développées, présentant des zones de coloration hétérogène. Ces résultats sont très préliminaires et quelques semaines supplémentaires de croissance des boutures seront nécessaires avant de pouvoir réaliser des tests plus quantitatifs : comparaison détaillée des croissances des racines et des parties aériennes, dosages de K<sup>+</sup> dans les différents organes, mesure des transports de K<sup>+</sup> (éventuellement à l'aide du traceur <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>), mesures de conductance stomatique... Si les plantes exprimant le canal mutant dominant négatif présentaient effectivement un phénotype, elles pourraient permettre à la fois de préciser le rôle de SOR *in planta*, et d'analyser l'impact de modifications

des transports et de l'accumulation de K<sup>+</sup> sur la physiologie de la baie et la qualité du moût. Par rapport à ce dernier objectif, il est important de remarquer que la possibilité de greffage de la vigne (bouture transformée sur porte-greffe sauvage ou réciproquement, ou boutures sauvages et transformées greffées sur une même souche...) constituerait un atout important.

\* \*  
\*

En conclusion, ce travail présente la première analyse des déterminants moléculaires du transport de K<sup>+</sup> chez la vigne. Nous avons identifié deux canaux potassiques, analysé leurs caractéristiques fonctionnelles et leur profil d'expression *in planta*. Ce travail a requis la mise en œuvre de la technique de transgénèse, qui est relativement longue et complexe dans le cas de cette plante. Malheureusement, nous n'avons pas pu valoriser ce travail dans le temps imparti à une thèse. Les résultats que nous avons obtenus et les vignes transgéniques que nous avons construites sont cependant susceptibles de constituer des éléments importants dans le développement de cette thématique, offrant en perspective des solutions durables pour améliorer l'équilibre acido-basique des baies et la qualité des moûts.

## Références bibliographiques

- Anderson J A, Huprikar S S, Kochian L V, Lucas W J et Gaber R F** (1992) Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceeding of the National Academy of Science Of USA* **89**: p 3736-3740.
- Armstrong F, Leung J, Grabov A, Brearley J, Giraudat J et Blatt MR** (1995) Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K<sup>+</sup> channels is suppressed by *abi1-1*, a mutant *Arabidopsis* gene encoding a putative protein phosphatase. *Proceeding of the National Academy of Science Of USA* **92**: p 9520-9524.
- Armstrong F et Blatt M R** (1995) Evidence for K<sup>+</sup> channel control in *Vicia faba* guard cells coupled by G-proteins to a 7-TMS receptor mimetic. *The Plant Journal* **8**: p 187-198.
- Assmann S M** (1993) Signal transduction in guard cells. *Annual Review of Cellular Biology* **9**: p 345-375.
- Assmann S M et Shimazaki K-I** (1999) The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscissic acid. *Plant Physiology* **119**: p 809-815.
- Assmann S M** (1999) The cellular basis of guard cell sensing of rising CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment* **22**: p 629-637.
- Aubourg S, Kreis M et Lecharny A** (1999) The DEAD box RNA helicase family in *Arabodopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **27**: p 628-636.
- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidam J G, Smith J A et Struhl K** (1993) Current protocols in molecular biology. USA, John Wiley & Sons.
- Baizabal-Aguirre V M, Clemens S, Uozomi N et Schroeder J I** (1999) Suppression of inward-rectifying K<sup>+</sup> channels KAT1 and AKT2 by dominant negative point mutations in the KAT1 alpha-subunit. *Journal of Membrane Biology* **167**: p 119-125.
- Banuelos M A, Klein R D, Alexander-Bowman S J et Rodriguez-Navarro A** (1995) A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the KUP system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. *EMBO Journal* **14**: p 3021-3027.
- Baribault T J, Skene K G M, Cain P A et Steele Scott N** (1990) Transgenic grapevines : regeneration of shoots expressing β-glucuronidase. *Journal of Experimental Botany* **41**: p 1045-1049.
- Barro F, Cannell M E, Lazzeri P A et Barcelo P** (1998) The influence of auxins on transformation of wheat and tritordeum and analysis of transgene integration patterns in transformants. *Theoretical and Applied Genetic* **97**: p 684-695.
- Bartley I M, Knee M et Casimir M A** (1982) Fruit softening I. Changes in cell wall composition and endo-polygalacturonase in ripening pears. *Journal of Experimental Botany* **33**: p 1248-1255.
- Basset M, Conejero G, Lepetit M, Fourcroy P et Sentenac H** (1995) Organization and expression of the gene coding for the potassium transport system AKT1 of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **29**: p 947-958.
- Bechtold N, Ellis J et Pelletier G** (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences Paris* **316**: p 1194-1199.
- Benloch M, Moreng I et Rodriguez-Navarro A** (1989) Two modes of rubidium uptake in sunflower plants. *Plant Physiology* **90**: p 939-942.

- Berres R, Otten L, Tinland B, Margarini-Clog E et Walter B** (1992) Transformation of *Vitis* tissue by different strains of *Agrobacterium tumefaciens* containing T-6b gene. *Plant Cell Reports* **11**: p 192-195.
- Bertauche N, Leung J et Giraudat J** (1996) Protein phosphatase activity of abscisic acid insensitive (ABI1) protein from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry* **241**: p 193-200.
- Bessim R et Fournioux J C** (1992) Zone d'abscission et coulure de la vigne. *Vitis* **31**: p 9-21.
- Blanke M M et Leyhe A** (1987) Stomatal activity of the grape berry cv. Riesling, Müller-Thurgau and Ehrenfelser. *Journal of Plant Physiology* **127**: p 451-460.
- Blanke M M et Leyhe A** (1988) Stomatal and cuticular transpiration of the cap and berry of grape. *Journal of Plant Physiology* **132**: p 250-253.
- Blanke M M et Lenz F** (1989) Fruit photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* **12**: p 31-46.
- Blanke M M, Pring R J et Baker E A** (1999) Structure and elemental composition of grape berry stomata. *Journal of Plant Physiology* **154**: p 477-481.
- Blatt M R, Thiel G et Trentham D R** (1990) Reversible inactivation of K<sup>+</sup> channel of *Vicia faba* stomatal guard cells following the photolysis of caged inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature* **191**: p 766-769.
- Blatt M R et Armstrong F** (1993) K<sup>+</sup> channel of stomatal guard cell: abscisic-acid-evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasmic pH. *Planta* **191**: p 330-341.
- Blatt M R et Gradmann D** (1997) K<sup>+</sup> sensitive gating of the K<sup>+</sup> outward rectifier in *Vicia faba* guard cells. *Journal of Membrane Biology* **58**: p 241-256.
- Boss P K, Davies C et Robinson S P** (1996) Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Molecular Biology* **32**: p 565-596.
- Brady C J** (1987) Fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **38**: p 155-178.
- Brown J W S, Smith P et Simpson C G** (1996) Arabidopsis consensus intron sequences. *Plant Molecular Biology* **32**: 531-535.
- Brüggemann L, Dietrich P, Dreyer I et Hedrich R** (1999) Pronounced differences between the native K<sup>+</sup> channels and KAT1 and KST1 α-subunit homomers of guard cells. *Planta* **207**: p 370-376.
- Butler A D, Wei A G, Baker K et Slakoff L** (1989) A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. *Science* **243**: p 943-947.
- Butt A D, Blatt MR et Ainsworth CC** (1997) Expression, evolution and genomic complexity of potassium ion channel of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **150**: p 652-660.
- Candolfi-Vasconcelos M C et Koblet W** (1990) Yield, fruit quality, bud fertility and starch reserves of the wood as a function of leaf removal in *Vitis vinifera* - Evidence of compensation and stress recovering. *Vitis* **29**: p 199-221.
- Candolfi-Vasconcelos M C, Koblet W, Howell G S et Zweifel W** (1994) Influence of defoliation, rootstock, training system, and leaf position on gas exchange of Pinot noir grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* **45**: p 173-180.
- Cao Y, Crawford NM et Schroeder JI** (1995a) Amino terminus and the first four membrane spanning segments of the *Arabidopsis* K<sup>+</sup> channel KAT1 confer inward-rectification property of plant-animal chimeric channels. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: p 17697-17701.

Cao Y, Ward JM, Kelly WB, Ichida AM, Gaber RF, Anderson JA, Uozumi NU et Crawford N M (1995b) Multiple genes, tissue specificity, and expression-dependant modulation contribute to the functional diversity of potassium channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **109**: p 1093-1106.

Champagnol F (1984) Eléments de physiologie de la vigne et de viticulture générale. Montpellier, Champagnol, F.

Cheeseman J M (1988) Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology* **87**: p 547-550.

Church G W et Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proceeding of the National Academy of Science Of USA* **81**: p 1991-1995.

Clarkson D T et Hanson J B (1980) The mineral nutrition of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* **31**: p 239-298.

Clarkson D T (1993) Roots and the delivery of solutes to the xylem. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **341**: p 5-17.

Clough S J et Bent A F (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: p 735-743.

Considine J A et Knox R B (1979) Development and histochemistry of the cells, cell walls, and cuticle of the dermal system of fruits of the grape, *Vitis vinifera* L. *Protoplasma* **99**: p 347-365.

Coombe B G (1976) The development of fleshy fruits. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **27**: p 507-528.

Coombe B G (1987) Distribution of solutes within the developing grape berry in relation to its morphology. *American Journal of Enology and Viticulture* **38**: p 120-127.

Coombe B G (1992) Research on development and ripening of the grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**: p 101-110.

Creasy G L, Price S F et Lombard P B (1993) Evidence for xylem discontinuity in Pinot noir and Merlot grapes : dye uptake and mineral composition during berry maturation. *American Journal of Enology and Viticulture* **44**: p 187-192.

Czempinski K, Zimmermann S, Ehrhardt T et Müller-Röber B (1995) New structure and function in plant K<sup>+</sup> channel: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca<sup>2+</sup> dependence. *The EMBO Journal* **16**: p 2565-2575.

Czempinski K, Gaedeke N, Zimmermann S et Müller-Röber B (1999) Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *Journal of Experimental Botany* **50**: p 955-966.

Daram P, Urbach S, Gaymard F, Sentenac H et Chérel I (1997) Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *The EMBO Journal* **16**: p 3455-3463.

Darnel J, Lodish H et Baltimore D (1989) Transport à travers les membranes cellulaires. La Cellule Biologie Moléculaire. D. e. Vigot. Paris: p 617-666.

Davies C et Robinson S P (1996) Sugar accumulation in grape berry. Cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues. *Plant physiology* **111**: p 275-283.

Davies C et Robinson S P (2000) Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiology* **122**: p 803-812.

De Boer A H et Wegner L H (1997) Regulatory mechanisms of ion channels in xylem paranchyma cells. *Journal of Experimental Botany* **48**: p 441-449.

De Boer A H (1999) Potassium translocation into the root xylem. *Plant Biology* **1**: p 36-45.

**DeCoursey T E** (1995) Voltage-activated proton currents in membrane patches of rat alveolar epithelial cells. *J. Physiol.* **489**: p 299-307.

**Delas J, Molot C et Soyer J P** (1989) Qualité et constitution des raisins de cuve. Fertilisation minérale de la vigne et teneurs en potassium des baies, des moûts et des vins. *4ème Symposium International d'Oenologie-Actualités Oenologiques*, Bordeaux.

**Delmas J** (1971) Recherches sur la nutrition minérale de la vigne, *Vitis vinifera* var. Merlot, en aquiculture. *Thèse de doctorat*. Université de Bordeaux, Bordeaux.

**DeWitt N D, Harper JF et Sussman MR** (1991) Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. *The Plant Journal* **1**: p 121-128.

**DeWitt N D et Sussman M R** (1995) Immunocytochemical localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump ( $H^+$ -ATPase) in phloem companion cells. *The Plant Cell* **7**: p 2053-2067.

**Donèche B et Chardonnet C** (1992) Evolution et localisation des principaux cations au cours du développement du raisin. *Vitis* **31**: p 175-181.

**Dornelas M C, Lejeune B, Dron M et Kreis M** (1998) The *Arabidopsis SHAGGY*-related protein kinase (ASK) gene family : structure, organization and evolution. *Gene* **212**: p 249-257.

**Dornelas M C, wittich P, von Recklinghausen I, von Lammeren A et Kreis M** (1999) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis SHAGGY*-related protein kinase (ASK) multigene family. *Plant Molecular Biology* **39**: p 137-147.

**Downey P, Szabo I, Ivashikina N, Negro A, Guzzo F, Ache P, Hedrich R, Terzi M et Lo Schiavo F** (2000) Kdc1, a novel carrot root  $K^+$  channel : cloning, characterisation and expression in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: p 39420-39426.

**Drew M C, Saker LR, Barber SA et Jenkins W** (1984) Changes in the kinetics of phosphate and potassium absorption in nutrient-deficient barley roots measured by a solution-depletion technique. *Planta* **160**: p 490-499.

**Drew M C et Saker L R** (1984) Uptake and long-distance transport of phosphate, potassium and chloride in relation to the internal concentrations in barley : evidence of non-allosteric regulation. *Planta* **160**: 500-507.

**Dreyer I, Antunes S, Hoshi T, Müller-Röber B, Palme K, Pongs O, Reintanz B et Hedrich R** (1997) Plant  $K^+$  channel  $\alpha$ -subunits assemble indiscriminately. *Biophysical Journal* **72**: p 2143-2150.

**Dumont J N** (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). *Journal of Morphology* **136**: p153-180.

**Düring H, Lang A et Oggionni F** (1987) Patterns of water flow in Roesling berries in relation to developmental changes in their xylem morphology. *Vitis* **26**: p 123-131.

**Ebel J et Mithöfer A** (1998) Early events in the elicitation of plant defense. *Planta* **206**: p 335-348.

**Ehrhardt T, Zimmermann S et Müller Röber B** (1997) Association of plant  $K^+$  channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. *FEBS letters* **409**: p 166-170.

**Eisenman G** (1961) On the elementary atomic origin of equilibrium ionic specificity. Membrane transport and metabolism. A. Kleinzeller. London, London Academic: p 163-179.

**Eisenman G et Horn R** (1983) Ionic selectivity revisited : the role of kinetic and equilibrium processes in ion permeation through channels. *Journal of Membrane Biology* **76**: p 197-225.

**Engels C et Marschner H** (1992) Adaptation of potassium translocation into the shoot of maize (*Zea mays*) to shoot demand : evidence for xylem loading as a regulation step. *Physiologia Plantarum* **86**: p 263-268.

**Epstein E, Rains D W et Elzam O E** (1963) Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proceeding of the National Academy of Science Of USA* **49**: p 684-692.

**Fairley-Grenot K A et Assmann S M** (1991) Evidence for G-protein regulation of inward K<sup>+</sup> channel current in guard cells of faba bean. *The Plant Cell* **3**: p 1037-1044.

**Felle H, Kondorosi E, Kondorosi A et Schultze M** (1998) The role of ion fluxes in *Nod* factor signalling in *Medicago sativa*. *The Plant Journal* **1**: p 333-343.

**Fillion L** (1997) Aspects physiologiques, cytologiques et moléculaires des flux de glucides au cours de la maturation de la baie de raisin (*Vitis vinifera L.*). *Thèse de doctorat*. Université de Poitiers, Poitiers.

**Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Romieux C et Delrot S** (1999) Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant physiology* **120**: p 1083-1093.

**Findlay N, Oliver K J, Nii N et Coombe B G** (1987) Solute accumulation by grape pericarp cells. IV. Perfusion of pericarp apoplast via the pedicel and evidence for xylem malfunction in ripening berries. *Journal of Experimental Botany* **38**: p 668-679.

**Fougère-Rifot M, Park H S et Bouard J** (1995) Données nouvelles sur l'hypoderme et la pulpe des baies normales et millerandées d'une variété de *Vitis vinifera L.*, le Merlot noir. *Vitis* **34**: p 1-7.

**Fougère-Rifot M, Cholet C et Bouard J** (1996) Evolution des parois des cellules de l'hypoderme de la baie de raisin lors de leur transformation en cellule de pulpe. *Journal Interne des Sciences de la Vigne et du Vin* **30**: p 47-51.

**Fray R G, Wallace A, Grierson D et Lycett G W** (1994) Nucleotide sequence and expression of a ripening and water stress-related cDNA from tomato with homology to the MIP class of membrane channel proteins. *Plant Molecular Biology* **24**: p 539-543.

**Freeman B M et Kliewer W M** (1983) Effect of irrigation, crop level and potassium fertilization on Carignane vines. II. Grape and wine quality. *American Journal of Enology and Viticulture* **34**: p 197-207.

**Freeman W M, Walker S J et Vrana K E** (1999) Quantitative RT-PCR : pitfalls and potentials. *Biotechniques* **26**: p 112-125.

**Fu H-H et Luan S** (1998) AtKUP1: a dual-affinity K<sup>+</sup> transporter from *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**: p 63-73.

**Gamborg O L, Miller R A et Ojima K** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* **50**: p 1515-1518.

**Gassmann W, Ward JM et Schroeder JI** (1993) Physiological roles of inward-rectifying K<sup>+</sup> channels. *The Plant Cell* **5**: p 1491-1493.

**Gassmann W et Schroeder J I** (1994) Inward-rectifying K<sup>+</sup> channels in root hairs of wheat. *Plant Physiology* **105**: p 1399-1408.

**Gassmann W, Rubio F et Schroeder JI** (1996) Alkali cation selectivity of the wheat root high-affinity potassium transporter HKT1. *The Plant Journal* **10**: p 869-882.

**Gaymard F, Cerutti M, Horeau C, Lemaillat G, Urbach S, Ravallec M, Devauchelle G, Sentenac H et Thibaud JB** (1996) The baculovirus/insect cell system as an alternative to *Xenopus Oocytes*. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: p 22863-22870.

**Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, Michaux-Ferriere N, Thibaud J-B et Sentenac H** (1998) Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell* **94**: p 647-655.

- Gibrat R, Grouzis J-P, Rigaud J et Grignon C** (1990) Potassium stimulation of corn root plasmalemma ATPase. II. H<sup>+</sup> pumping in native and reconstituted vesicles with purified ATPase. *Plant Physiology* 93: p 1183-1189.
- Gilroy S, Read N D et Trewavas A J** (1990) Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 346: p 769-771.
- Glass A D M** (1977) Regulation of K<sup>+</sup> influx in barley roots: evidence for direct control by internal K<sup>+</sup>. *Australian Journal of Plant Physiology* 4: p 313-138.
- Glass A D M et Dunlop J** (1978) The influence of potassium content on the kinetics of potassium influx into excised ryegrass and barley roots. *Planta* 141: p 117-119.
- Glass A D et Fernando M** (1992) Homeostatic processes for the maintenance of the K<sup>+</sup> content of plant cells : a model. *Israel Journal of Botany* 41: p 145-166.
- Gonnet G M, Cohen M A et Benner S A** (1992) Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science* 256: p 1443-1445.
- Grabov A et Blatt M R** (1998) Co-ordination of signalling element in guard cell ion channel control. *Journal of Experimental Botany* 49: p 351-360.
- Greenspan M D, Shackel K A et Matthews M A** (1994) Developmental changes in the diurnal water budget of the grape berry exposed to water deficits. *Plant, Cell and Environment*: p 811-820.
- Greenspan M D, Schultz H R et Matthews M A** (1996) Field evaluation of water transport in grape berries during water deficits. *Physiologia Plantarum* 97: p 55-62.
- Gutierrez-Granda M J et Morrison J C** (1992) Solute distribution and malic enzyme activity in developing grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 43: p 323-328.
- Guyon P, Chilton M D, Petit A, et Tempe J** (1980) Agropine in "null-type" crown gall tumors : evidence for generality of the opine concept. . *Proceeding of the National Academy of Science Of USA* 77: p 2693-2697.
- Hale C R** (1977) Relation between potassium and the malate and tartrate contents of grape berries. *Vitis* 16: p 9-19.
- Hardie W J, O'Brien T P et Jaudzems V G** (1996) Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape, *Vitis vinifera L. Australian Journal of Grape and Wine Research* 2: p 97-142.
- Harris J M, Kriedermann P E et Possingham J V** (1968) Anatomical aspects of grape berry development. *Vitis* 7: p 291-298.
- Hartje S, Zimmermann S, Klonus D et Mueller-Roeber B** (2000) Functional characterisation of LKT1, a K<sup>+</sup> uptake channel from tomato root hair, and comparison with the closely related potato inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel SKT1 after expression in *Xenopus oocytes*. *Planta* 210: p 723-731.
- Hawker J S** (1969) Changes in the activitis of malic enzyme, malate dehydrogenase, phosphopyruvate carboxylase and pyruvate decarboxylase durinf development of a non-climacteric fruit (the grape). *Phytochemistry* 8: p 19-23.
- Hawkins J D** (1988) A survey on intron and exon lengths. *Nucleic Acids Research* 16: p 9893-9908.
- Hedrich R, Moran O, Conti F, Bush H, Becker D, Gambale F, Dreyer I, Küch A, Neuwinger K et Palme K** (1995) Inward rectifier potassium channels in plants differ from their animal counterparts in response to voltage and channel modulators. *European Journal of Biochemistry* 24: p 107-115.

**Heginbotham L et MacKinnon R** (1992) The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron* 8: p 483-491.

**Heginbotham L, Lu Z, Abramson T et MacKinnon R** (1994) Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophysical Journal* 66: p 1061-1067.

**Hesse J E, Wieczorek L, Altendorf K, Reicin A S, Dorús E et Epstein W** (1984) Sequence homology between two membrane transport ATPases, the Kdp-ATPase of *Escherichia coli* and the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sacroplasmic reticulum. *Proceeding of the National Academy of Science Of USA* 81: p 4746-47580.

**Hirsch R E, Lewis BR, Spalding EP et Sussman MR** (1998) A role for the potassium channel in plant nutrition. *Science* 280: p 918-921.

**Hirsch R E et Sussman M R** (1999) Improving nutrient capture from soil by the genetic manipulation of crop plants. *TIBTECH* 17: p 356-360.

**Ho L C, Grange R I et Picken A J** (1987) An analysis of the accumulation of water and dry matter in tomato fruit. *Plant, Cell and Environment* 10: p 157-162.

**Hoagland D R et Arnon D I** (1950) *Californian Agricultural Experimantal Bulletin.*: circular 347.

**Hoffman M** (1991) New role found for a common protein "motif". *Science* 253: p 742.

**Hood E E, Helmer G L, Fraley R T et Chilton M D** (1986) The hypervirulence of Agrobacterium tumefaciens A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of the T-DNA. *Journal of Bacteriology* 168: p 1291-1031.

**Horeau C** (1998) Caractérisation fonctionnelle, après expression hétérologue dans les cellules Sf9, d'AKT1, un canal cloné chez *Arabidopsis thaliana* impliqué dans l'absorption de K<sup>+</sup> par la racine. *Thèse de doctorat.* Université Paris-Sud ORSAY, Orsay.

**Hoshi T** (1995) Regulation of voltage dependence of the KAT1 channel by intracellular factors. *Journal of general physiology* 105: p 309-328.

**Hrazdina G, Parsons G F et Mattick L R** (1994) Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 35: p 220-227.

**Ichida A M, Pei Z-M, Baizabal-Aguirre VM, Turner KJ et Schroeder JI** (1997) Expression of a Cs<sup>+</sup>-resistant guard cell K<sup>+</sup> channel confers Cs<sup>+</sup>-resistant, light-induced stomatal opening in transgenic *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 9: p 1843-1857.

**Iland P G et Coombe B G** (1988) Malate, tartrate, potassium and sodium in flesh and skin of Shiraz grapes during ripening : concentration and compartmentation. *American Journal of Enology and Viticulture* 39: p 71-75.

**Jackson D I** (1986) Factors affecting soluble solids, acid, pH and color in grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: p 179-183.

**Jan L Y et Jan Y N** (1997) Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annual Review of Neuroscience* 20: p 91-123.

**Jona R et Botta R** (1988) Fruit set and early berry development in two grapevine cultivars. *Israël Journal of Botany* 37:p 203-216.

**Kanellis A K et Roubelakis-Angelakis K A** (1993) Grape. Biochemistry of Fruit Ripening. G. Seymour, J. Taylor and G. Tucker. London, Chapman Hall.: p 189-234.

**Kaplan W D et Trout W E** (1969) The behavior of four neurological mutants of Drosophila. *Genetics* 61: p 399-409.

- Ketchum K A et Slayman C W** (1996) Isolation of a ion channel from *Arabidopsis thaliana* using the H5 signature sequence from voltage dependent K<sup>+</sup> channel. *FEBS letters* **378**: p 19-26.
- Kidou S I, Tsukamoto S, Kobayashi S et Ejiri S I** (1998) Isolation and characterization of a rice cDNA encoding the γ-subunit of translation elongation factor 1B (eEF1By). *FEBS letters* **434**: p 382-386.
- Kim E J, Kwak JM, Uozumi N et Schroeder JI** (1998) AtKUP1: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *The Plant Cell* **10**: p 51-62.
- Kliewer W M, Brian B M et Hossom C** (1983) Effect of irrigation, crop level and potassium fertilization on Carignane vines. I. Degree of water stress and effect on growth and yield. *American Journal of Enology and Viticulture* **34**: p 186-196.
- Kochian L V et Lucas W J** (1982) Potassium transport in corn roots. *Plant Physiology* **70**: p 1723-1731.
- Kochian L V, Xin-Zhi J et Lucas W J** (1985) Potassium transport in corn roots. *Plant Physiology* **79**: p 771-776.
- Kochian L V et Lucas W J** (1988) Potassium transport in roots. *Advances in Botanical Research* **15**: p 136-151.
- Kochian L V, Shaff J E et Lucas W J** (1989) High affinity K<sup>+</sup> uptake in Maize roots. *Plant Physiology* **91**: p 1202-1211.
- Köhler C, Merkle T et Neuhaus G** (1998) Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **18**: p 97-104.
- Kumpf R A et Dougherty D A** (1993) A mechanism for ion selectivity in potassium channels : computational studies of cation-π interactions. *Science* **261**: p 1708-1710.
- Kühn C, Franceschi VR, Schulz A, Lemoine R et Frommer WB** (1997) Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* **275**: p 1298-1300.
- Lacombe B et Thibaud J-B** (1998) Evidence for a multi-ion pore behavior in the plant potassium channel KAT1. *Journal of Membrane Biology* **166**: p 91-100.
- Lacombe B, Pilot G, Michard E, Gaymard F, Sentenac H et Thibaud J B** (2000) A Shaker-like K<sup>+</sup> channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **12**: p 837-851.
- Lacombe B** (2000) Caractérisation fonctionnelle en système hétérologue de canaux potassiques de type Shaker clonés chez *Arabidopsis thaliana*. *Thèse de doctorat*. ENSA-Montpellier, Montpellier.
- Lagarde D, Basset M, Lepetit M, Conejero G, Gaymard F, Astruc S et Grignon C** (1996) Tissue-specific expression of *Arabidopsis* AKT1 gene is consistent with a role in K<sup>+</sup> nutrition. *The Plant Journal* **9**: p 195-203.
- Lang A et Thorpe M R** (1989) Xylem, phloem, and transpiration flows : application of a technique for measuring the volume of attached fruits to high resolution using Archimede's principle. *Journal of Experimental Botany* **40**: p 1069-1078.
- Lang A** (1990) Xylem, phloem and transpiration flows in developing apple fruits. *Journal of Experimental Botany*: p 495-503.
- Lang A et Düring H** (1991) Partitioning control by water potential gradient : evidence for compartmentation breakdown in grape berries. *Journal of Experimental Botany* **42**: p 1117-1122.
- Le Gall O, Torregrosa L, Danglot Y, Candresse T et Bouquet A** (1994) Agrobacterium-mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV). *Plant science* **102**: p 161-170.

- Leng Q, Mercier R W, Yao W et Berkowitz G A** (1999) Cloning and first functional characterization of a plant cyclic nucleotide-gated cationchannel. *Plant Physiology* **121**: p 753-761.
- Lesage F, Reyes r, Fink M, Duprat F, Guillemaire E et Lazdunski M** (1996) Dimerization of TWIK-1 K<sub>+</sub> channel subunits via a disulfite bridge. *The EMBO Journal* **15**: p 6400-6407.
- Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Chefdor F et Giraudat J** (1994) *Arabidopsis* ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264**: p 1448-1452.
- Leung J, Merlot S et Giraudat J** (1997) The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE (ABI2) and ABI1 encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *The Plant Cell* **9**: p 759-771.
- Levy J F, Chaler G, Camhaji E et Hego C** (1972) Nouvelle étude statistique des relations entre la composition minérale des feuilles et les conditions d'alimentation de la vigne. *Vignes Vins* **212**: p 21-25.
- Lew R R** (1990) Electrogenic transport properties of growing *Arabidopsis* root hairs. The plasma membrane proton pump and potassium channels. *Plant Physiology* **97**: p 1527-1534.
- Leyhe A et Blanke M M** (1989) Carbon economy of the grape inflorescence. CO<sub>2</sub> exchange of the grape inflorescence. *Viticulture and Enological Science*. **44**: p 147-150.
- Li X O, Liu C N, Ritchie S W, Peng J Y, Gelvin S B et Hodges T K** (1992) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of gusA in rice. *Plant Molecular Biology* **20**: p 1037-1048.
- Liman E R, Tytgat J et Hess P** (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* **9**: p 861-71.
- Lobréaux S, Hardy T et Briat J F** (1993) Abscisic acid is involved in the iron-induced synthesis of maize ferritin. *EMBO Journal* **12**: p 651-657.
- Loulakakis K A et Roubelakis-Angelakis K A** (1996) Caracterization of *Vitis vinifera* L. glutamine synthetase and molecular cloning of cDNAs for the cytosolic enzyme. *Plant Molecular Biology* **31**: p 983-992.
- Luan S, Li W, Rusnak F, SM Assmann et Schreiber SL** (1993) Immunosuppressant implicate protein phosphatase regulation of K<sup>+</sup> channel in guard cells. *Proceeding of the National Academy of Science Of USA* **90**: p 2202-2206.
- Lux S E, John K M et Bennett V** (1990) Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins. *Nature* **344**: p 36-42.
- Lütcke H A, Chow K C, Mickel F S, Moss K A, Kern H F et Scheele G A** (1987) Selectrin of AUG initiation codons differs in plant and animal. *The EMBO Journal* **6**: p 43-48.
- Lüttge U et Clarkson D T** (1989) II Meneral nutrition : potassium. *Progress in Botany* **50**: p 36-42.
- Maathuis F J M et Sanders D** (1993) Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **191**: p 302-307.
- Maathuis F J M et Sanders D** (1994) Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proceeding of the National Academy of Science Of USA* **91**: p 9272-9276.
- Maathuis F J M et Sanders D** (1995) Contrasting roles in ion transport of two K<sup>+</sup>-channel types in root cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **197**: p 456-464.
- Maathuis F J M et Sanders D** (1996) Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiologia plantarum* **96**: p 158-168.

- Maathuis F J M et Sanders D** (1997) Regulation of K<sup>+</sup> absorption in plant root cells by external K<sup>+</sup> : interplay of different plasma membrane K<sup>+</sup> transporters. *Journal of Experimental Botany* 48: p 451-458.
- MacRobbie E A C** (1998) Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 353: p 1475-1488.
- Maroc J** (1967) La conversion du gluconate en glucose et ses relations avec la biogénèse de l'acide tartrique. *Physiologie Végétale* 5: p 37-46.
- Marschner H, Kirby EA et Cakmak I** (1996) Effect of the nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany* 47: p 1255-1263.
- Martinelli L et Mandolino G** (1994) Genetic transformation and regeneration of transgenic plants in grapevine (*Vitis rupestris* S.). *Theoretical and Applied Genetic* 88: p 621-628.
- Matthews M A et Anderson M** (1989) Reproductive development in grape (*Vitis vinifera* L.) : responses to seasonal water deficit. *American Journal of Enology and Viticulture* 40: p 52-60.
- Mauro M C, Toutain S, Waletr B, Pinck L, Otten L, Coutos-Thevenot P, Deloire A et Barbier P** (1990) High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Science* 112: p 97-106.
- McDowell J M, Huang S, McKinney E C, An Y-Q et Meagher R B** (1996) Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 142: p 587-602.
- Mengel K et Haeder H-E** (1977) Effect of potassium supply on the rate of phloem sap exudation and the composition of phloem sap of *Ricinus communis*. *Plant Physiology* 59: p 282-284.
- Michaelis M et Menten M** (1913) Kinetik der invertinwirkung. *Biochemika. Zeitung*. 49: p 333-369.
- Miller C** (1993) Potassium selectivity in proteins : oxygen cage or in the F ace? *Science* 261: p 1692-1693.
- Molodell J, Bender W, et Meselson M** (1983) *Drosophila melanogaster* mutations suppressible by the suppressor of Hairy-wing are insertions of a 7.3-kilobase mobile element. *Proceeding of the National Academy of Science Of USA* 80: p1678-1682.
- Morris J R, Sims C A et Cawthon D L** (1983) Effects of excessive potassium levels on pH, acidity and color of fresh and stored grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture* 34: p 35-39.
- Murashige T et Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissues culture. *Physiologia Plantarum* 15: p 473-497.
- Müller-Röber B, Ellenberg J, Provart N, Willmitzer L, Busch H, Becker D, Dietrich P, Hoth S et Hedrich R** (1995) Cloning and electrophysiological analysis of KST1, an inward rectifying K<sup>+</sup> channel expressed in potato guard cells. *the EMBO Journal* 14: p 2409-2416.
- Nakamura R L, Mc Kendree WL, Hirsch RE, Sedbrook JC, Gaber RF et Sussman MR** (1995) Expression of an *Arabidopsis* potassium channel gene in guard cells. *Plant Physiology* 109: p 371-374.
- Nakamura R L, Anderson JA et Gaber RF** (1997) Determination of key structural requirement of a K<sup>+</sup> channel pore. *The Journal of Biological Chemistry* 272: p 1011-1018.
- Nitsch J P et Nitsch C** (1969) Haploid plant from pollen grains. *Science* 165: p 85-87.
- Ollat N** (1997) Bases physiologiques et anatomiques de la croissance des baies de *Vitis vinifera* cv Cabernet Sauvignon. *Thèse de doctorat*. ENSA-Montpellier, Montpellier.
- Oparka K J et Turgeon R** (1999) Sieve elements and companion cells-Traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* 11: p 739-750.

**Papazian D M, Schwarz T L, Tempel B L, Jan Y N et Yan L Y** (1987) Cloning of the genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **237**: p 749-753.

**Papazian D M, Timpe L C, Jan Y N et Jan L Y** (1991) Alteration of voltage dependance of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* **349**: p 305-310.

**Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubier-Comella P et Délyseny M** (1994) Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: roles of the ABI3 locus and endogenous abscisic acid. *The Plant Cell* **6**: 1567-1582.

**Parcy F et Giraudat J** (1997) Interactions between the ABI1 and the ectopically expressed ABI3 genes in controlling abscisic acid responses in *Arabidopsis* vegetative tissues. *The Plant Journal* **11**: p 693-702.

**Park H S** (1995) Le péricarpe des baies de raisin normales et millerandées : ontogénèse de la structure et évolution de quelques constituants biochimiques, notamment les tannins. *Thèse de doctorat*. Université Bordeaux II, Bordeaux.

**Patrick J W** (1997) Phloem unloading : sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: p 191-222.

**Pei Z-M, Kuchitsu K, Ward JM, Schwarz M et Schroeder JI** (1997) Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *The Plant Cell* **9**: p 409-423.

**Pei Z M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klüsener B, Allen G J, Grill E et Schroeder J I** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature* **406**: p 731-734.

**Perl A, Lotan O, Abu-Abied M et Holland D** (1996) Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.) : the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* intercations. *Nature Biotechnology* **14**: p 624-628.

**Peynaud E et Ribéreau-Gayon P** (1971) The grape. The biochemistry of fruits and their products. A. C. Hulme. Londres, Academic press. 2: p 179-205.

**Philippar K, Fuchs I, Lüthen H, Hoth S, Bauer C S, Haga K, Thiel G, Ljung K, Sandberg G, Böttger M, Becker D et Hedrich R** (1999) Auxin-induced K<sup>+</sup> channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proceeding of the National Academy of Science Of USA* **96**: p 12186-12191.

**Pilot G** (1999) La famille des canaux K<sup>+</sup> de type Shaker : expression et rôle dans la plante. *Thèse de doctorat*. Université Montpellier II, Montpellier.

**Possner D R E et Kliewer W M** (1985) The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis* **24**: p 229-240.

**Pratt C** (1971) Reproductive anatomy in cultivated grapes - A review. *American Journal of Enology and Viticulture* **22**: p 93-109.

**Primikirios N I et Roubelakis-Angelakis K A** (1999) Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures. *Planta* **208**: p 574-582.

**Quintero F J et Blatt M R** (1997) A new family of K<sup>+</sup> transporters from *Arabidopsis* that are conserved across phyla. *FEBS letters* **415**: p 206-211.

**Rains D W et Epstein E** (1967a) Sodium absorption by barley roots : its mediation by mechanism 2 of alkali cation transport. *Plant Physiology* **42**: p 319-323.

**Rains D W et Epstein E** (1967b) Sodium absorption by barley roots : role of the dual mechanism of alkali cation transport. *Plant Physiology* **42**: p 314-318.

**Rathjen A H et Robinson S P** (1992) Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. *Plant physiology* **99**: p 1619-1625.

**Riesmeier J W, Willmitzer L et Frommer W B** (1994) Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *The EMBO Journal* **12**: p 1-7.

**Roberston G L, Eschenbruch R et Cresswell K S** (1980) Seasonal changes in the pectin substances of grape and their implication in juice extraction. *American Journal of Enology and Viticulture* **31**: p 162-164.

**Roberts S K et Tester M** (1995) Inward and outward K<sup>+</sup>-selective currents in the plasma membrane of protoplasts from maize roots cortex and stele. *The Plant Journal* **8**: p 811-825.

**Roberts S K** (1998) Regulation of K<sup>+</sup> channels in maize roots by water stress and abscisic acid. *Plant Physiology* **116**: p 145-153.

**Robinson S P, Jacobs A K et Dry I B** (1997) A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiology* **114**: p 771-778.

**Rodriguez P L, Benning G et Grill E** (1998) ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS letters* **421**: p 185-190.

**Rubio F, Gassmann W et Schroeder JI** (1995) Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* **270**: p 1660-1663.

**Rudy B** (1988) Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* **25**: p 729-749.

**Ruffner H P et Hawker J S** (1977) Control of glycolysis in ripening berries of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* **16**: p 1171-1175.

**Ruffner H P** (1982a) Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis* : A review - Part B. *Vitis* **21**: p 346-358.

**Ruffner H P** (1982b) Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis* : A review - Part A. *Vitis* **21**: p 24-259.

**Ruffner H P, Possner D, Brem S et Rast D M** (1984) The physiological role of malic enzyme in grape ripening. *Planta* **160**: p 144-148.

**Saito K et Kasai Z** (1968) Accumulation of tartaric acid in the ripening process of grapes. *Plant Cell Physiology* **9**: p 529-537.

**Sanger F, Nicklen S et Coulson A R** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Science Of USA* **74**: p 5463-5467.

**Santa-Maria G, Rubio F, Dubcovsky J et Rodriguez-Navarro** (1997) The HAK1 gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. *The Plant Cell* **9**: p 2281-2289.

**Schachtman D P, Schroeder JI, Lucas WJ, Anderson JA et Gaber RF** (1992) Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis KAT1* cDNA. *Science* **258**: p 1654-1658.

**Schachtman D P et Schroeder J I** (1994) Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* **370**: p 655-658.

**Schleyer M et Bakker E P** (1993) Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that the K<sup>+</sup>-uptake protein Kup from *Escherichia coli* is composed of a hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C-terminus. *Journal of Bacteriology* **175**: p 6925-6931.

**Schroeder J I et Hagiwara S** (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **338**: p 427-430.

**Scorza R, Cordts J M, Gray D J, Gonsalves D, Emershad R L et Ramming D W** (1996) Producing transgenic "Thompson Seedless" grape (*Vitis vinifera* L.) plants. *Journal of American Society for Horticultural Sciences* **121**: p 616-619.

**Sentenac H, Bonneau N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaynard F et Grignon C** (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* **256**: p 663-665.

**Shih T M et Goldin A L** (1997) Topology of the Shaker potassium channel probed with hydrophilic epitope insertions. *Journal of Cellular Biology* **136**: p 1037-1045.

**Silacci M W et Morrison J C** (1990) Changes in pectin content of Cabernet Sauvignon grape berries during maturation. *American Journal of Enology and Viticulture* **41**: p 111-115.

**Sjölund R D** (1997) The phloem sieve element: a river runs through it. *The Plant Cell* **9**: p 1137-1146.

**Spalding E P, Hirsch RE, Lewis DE, Qi Z et Sussman MR** (1999) Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity. *Journal of general physiology* **113**: 909-918.

**Sparvoli F, Martin C, Scienza A, Gavazzi G et Tonelli C** (1994) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology* **24**: p 743-755.

**Stein W D** (1990) Channels, carriers and pumps. An introduction to membrane transport. San Diego, CA.

**Stines A P, Naylor D J, Hoj P B et van Heeswijck R** (1999) Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of  $\Delta$ -proline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. *Plant Physiology* **120**: p 923-931.

**Stoev K et Ivantchev V** (1977) Données nouvelles sur le problème de la translocation descendante et ascendante des produits de la photosynthèse de la vigne. *Vitis* **16**: p 253-262.

**Stolzfus A, Logsdon JM, Palmer JD et Doolittle WF** (1997) Intron "sliding" and the diversity of intron positions. *Proceeding of the National Academy of Science Of USA* **94**: p 10739-10744.

**Storey R** (1987) Potassium localization in the grape berry pericarp by energy-dispersive X-ray microanalysis. *American Journal of Enology and Viticulture* **38**: p 301-309.

**Swift J G, Buttrose M S et Possingham J V** (1973) Stomata and starch in grape berries. *Vitis* **12**: p 38-45.

**Tattersall D B, van Heeswijck R et Hoj P B** (1997) Identification and characterization of fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiology* **114**: p 759-769.

**Taureilles-Saurel C, Romieux C G, Robin J P et Flanzy C** (1995) Grape (*Vitis vinifera* L.) malate déhydrogenase. I. Intracellular compartmentation of the isoforms. *American Journal of Enology and Viticulture* **46**: p 22-28.

**Taureilles-Saurel C, Romieux C G, Robin J P et Flanzy C** (1995) Grape (*Vitis vinifera* L.) malate déhydrogenase. II. Characterization of the major mitochondrial and cytosolic isoforms and their role in ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* **46**: p 29-36.

**Terrier N** (1997) Aspects bioénergétiques et moléculaires du stockage des acides organiques dans la baie de raisin (*Vitis vinifera* L.). *Thèse de doctorat*. ENSA-Montpellier, Montpellier.

**Tesnière C et Vayda M E** (1991) Method for the isolation of high-quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reports* **9**: p 242-251.

**Tester M** (1988) Potassium channel in the plasmalemma of *Chara corallina* are multi-ion pores : voltage-dependant blockade by  $Cs^+$  and anomalous permeabilities. *Journal of Membrane Biology* **105**: p 87-94.

**Thiel G et Wolf A H** (1997) Operation of K<sup>+</sup>-channel in stomatal movement. *Trends in Plant Science* 2: p 339-345.

**Thomine S, Zimmerman S, Van Duijn B, Barbier-Brygoo H et Guern J** (1994) Calcium channel antagonists induce direct inhibition of the outward rectifying K<sup>+</sup> channel in tobacco protoplasts. *FEBS letters* 340: p 45-50.

**Thomine S, Zimmerman S, Guern J et Barbier-Brygoo H** (1995) ATP-regulation of an anion channel at the plasma membrane of protoplasts from epidermal cells of *Arabidopsis* hypocotyls. *The Plant Cell* 5: p 2091-2100.

**Thompson G A et Schulz A** (1999) Macromolecular trafficking in the phloem. *Trends in Plant Science* 4: p 354-360.

**Torregrosa L** (1994) Culture *in vitro* et transformation génétique de la vigne : mise au point de protocoles de micropropagation et de régénération par organogenèse et embryogenèse chez des hybrides *Vitis* x *Muscadinia*; Obtention chez deux porte-greffes de racines et de plantes transgéniques produisant la protéine capsidiale du virus de la mosaïque chromée de la vigne (GCMV). *Thèse de doctorat*. ENSA-Montpellier, Montpellier.

**Torregrosa L, Torres-Vials M et Bouquet A** (1995) Somatic embryogenesis from leaves of *Vitis* x *Muscadinia* hybrids. *Vitis* 34: p 239-240.

**Torregrosa L et Bouquet A** (1995) *In vitro* propagation of *Vitis* x *Muscadinia* hybrids by microcuttings or axillary budding. *Vitis* 34: p 237-238.

**Touraine B, Grignon N et Grignon C** (1988) Charge in NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-fed soybean. *Plant Physiology* 88: p 605-612.

**Töpfer R, Mateit V, Gronenbon B, Schell J et Steinbiss H M** (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Research* 24: p 5890-5898.

**Truernit E et Sauer N** (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H<sup>+</sup> symporter gene directs expression of β-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196: p 564-570.

**Uozomi N, Kim E J, Rubio F, Yamagushi T, Muto S, Tsuboi A, Bakker E P, Nakamura T et Schroeder J I** (2000) The *Arabidopsis HKT1* gene homolog mediates inward Na<sup>+</sup> currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na<sup>+</sup> uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology* 122: p 1249-1259.

**Vale F R, Jackson WA et Volk RJ** (1987) Potassium influx into maize root systems. *Plant Physiology* 84: p 1416-1420.

**Véry A A, Gaymard F, Bosseux C, Sentenac H et Thibaud JB** (1995) Expression of cloned plant K<sup>+</sup> channel in *Xenopus* oocytes : analysis of macroscopic currents. *The Plant Journal* 7: p 321-332.

**Walker D J, Smith SJ et Miller AJ** (1995) Simultaneous measurement of intracellular pH and K<sup>+</sup> or NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in Barley root cells using triple-barreled, ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology* 108: p 743-751.

**Walker D J, Leigh RA et Miller AJ** (1996) Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proceeding of the National Academy of Science Of USA* 93: p 10510-10514.

**Wang T-B, Gassmann W, Rubio F, Schroeder JI et Glass ADM** (1998) Rapid up-regulation of HKT1, a high-affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. *Plant Physiology* 118: p 651-659.

**Wegner L H et De Boer A H** (1997a) Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K<sup>+</sup> homeostasis and long-distance signaling. *Plant Physiology* 115: p 1707-1719.

**Wegner L H et De Boer A H** (1997b) Two inward K<sup>+</sup> channels in the xylem parenchyma cells of barley roots are regulated by G-protein modulators through a membrane-delimited pathway. *Planta* 203: p 506-516.

**White P J et Lemtiri-Chlieh F** (1995) Potassium currents across the plasma membrane of protoplasts derived from rye roots : a patch-clamp study. *Journal of Experimental Botany* **46**: p 497-511.

**Winkler A, Cook J, Lider J A et Kliewer W M** (1974) General viticulture. Berkeley, University of California press.

**Zimmermann U, Meinken FC, Zhu JJ, Schneider H, Goldstein G, Kuchenbrod E et Haase A** (1994) Xylem water transport : is the available evidence consistent with the cohesion theory ? *Plant, Cell and Environment* **17**: p 1169-1181.

**Zimmermann S, Talke I, Ehrhardt T, Nast G et Müller-Röber B** (1998) Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. *Plant Physiology* **116**: p 879-890.

## **Identification et caractérisation de canaux potassiques chez la vigne.**

Un excès de K<sup>+</sup> dans les baies de raisin se traduit par une altération de l'équilibre acido-basique du moût, gravement préjudiciable aux qualités physico-chimiques et organoleptiques du vin. Nous nous sommes intéressés aux déterminants moléculaires du transport de K<sup>+</sup> dans la vigne, en recherchant des canaux potassiques de type Shaker, par criblage de banques d'ADN. Deux canaux ont été identifiés et caractérisés (analyse du profil d'expression *in planta* et des propriétés fonctionnelles dans l'ovocyte de xénope). Le premier canal, SOR, est très semblable aux canaux de la famille SKOR d'*Arabidopsis*. C'est un canal d'efflux, exprimé dans les parties aériennes végétatives et dans les baies. Son expression, analysée par RT-PCR quantitative, semble peu variable au cours du développement des fruits. SOR pourrait être impliqué dans la charge en K<sup>+</sup> de la baie. Le second canal, SIRK, est un canal d'influx, comme son orthologue KAT2 chez *Arabidopsis*. A l'aide d'une construction plaçant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur SIRK, nous avons constaté que SIRK est exprimé dans les cellules de garde des feuilles, des tiges et des pétioles, aussi bien en système hétérologue (chez *Arabidopsis*) qu'en système homologue, après transformation génétique de cals embryogènes de vigne. Il semble également exprimé dans les cellules de garde des baies avant la véraison. Dans une dernière étape, nous avons engagé une approche de génétique inverse en transformant la vigne avec un canal SOR doté d'un comportement de type mutant dominant négatif, et obtenu des plantes présentant apparemment un phénotype.

**Mots-clés :** vigne, canaux, potassium, expression de gènes, caractérisation fonctionnelle, GUS.

## **Identification and characterisation of vine K<sup>+</sup> channels.**

K<sup>+</sup> accumulation in grape berries results in decreased must acidity, leading to wines with poor storage and gustative properties. In this context, we started a project aimed at identifying the molecular determinants of K<sup>+</sup> transport in grapevine, focussing on Shaker-like K<sup>+</sup> channels. DNA library screenings allowed us to identify two channels. The first one, named SOR, is an outward rectifying channel, belonging to the same sub-family than the *Arabidopsis* SKOR channel. SOR is expressed in green aerial part and in the berries. It could be involved in berry K<sup>+</sup> loading. The second channel, named SIRK, is endowed with inward rectification, is orthologous to the *Arabidopsis* KAT2 channel and displays functional properties very similar to those of KAT2. In order to localise the expression of SIRK, SIRK promoter region was fused to GUS reporter gene and the resulting construct was expressed in *Arabidopsis* as well as in vine. GUS patterns analysis showed that SIRK is expressed in guard cells in the vegetative parts. SIRK expression pattern through berry development, analysed by RT-PCR suggests that this gene is also expressed in berry guard cells. Actually, SIRK is expressed in the berries as long as stomata are functional. Finally, a reverse genetic approach on SOR channel was started. We transformed vines with a dominant negative mutant of SOR channel. The resulting plants seem to present a phenotype when growing on low-K<sup>+</sup> medium, but further characterisation is still required.

**Key words :** vine, channel, potassium, gene expression, functional characterisation, GUS.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE  
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE DE MONTPELLIER

/ / / / / / / / / / / / / / / / / / /

THESE

Présentée à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier  
Pour obtenir le DIPLOME DE DOCTORAT

Discipline : Physiologie Moléculaire  
Formation Doctorale : Développement et Adaptation des Plantes  
Ecole Doctorale : Biologie Intégrative

Par  
**Eric Hosy**

**Propriétés fonctionnelles et rôles physiologiques de  
canaux K<sup>+</sup> de type Shaker chez *Arabidopsis thaliana* et  
*Vitis vinifera***

Travail réalisé dans le laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes  
UMR 5004 Agro-M/CNRS/INRA/Université Montpellier II  
Place Viala  
34060 Montpellier cedex 1

JURY :

<b>M<sup>me</sup> Hélène Barbier-Bryggo</b> , Directeur de Recherche, CNRS Gif/Yvette	Rapporteur
<b>M. Jacques Joyard</b> , Directeur de Recherche, CNRS CEA Grenoble	Rapporteur
<b>M. Claude Grignon</b> , Professeur, Agro-M Montpellier	Président du jury
<b>M. Thierry Simonneau</b> , Chargé de recherche, INRA Montpellier	Examinateur
<b>M. Alain Vavasseur</b> , Directeur de Recherche, CEA Cadarache	Examinateur
<b>M. Jean-Baptiste Thibaud</b> , Directeur de Recherche, CNRS Montpellier	Directeur de thèse

MINISTERE DE L'AGRICULTURE  
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE DE MONTPELLIER

/ / / / / / / / / / / / / / / / / / /

**THESE**

Présentée à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier  
Pour obtenir le DIPLOME DE DOCTORAT

Discipline : Physiologie Moléculaire  
Formation Doctorale : Développement et Adaptation des Plantes  
Ecole Doctorale : Biologie Intégrative

Par  
**Eric Hosy**

**Propriétés fonctionnelles et rôles physiologiques de  
canaux K<sup>+</sup> de type Shaker chez *Arabidopsis thaliana* et  
*Vitis vinifera***

Travail réalisé dans le laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes  
UMR 5004 Agro-M/CNRS/INRA/Université Montpellier II  
Place Viala  
34060 Montpellier cedex 1

JURY :

<b>M<sup>me</sup> Hélène Barbier-Bryggo</b> , Directeur de Recherche, CNRS Gif/Yvette	Rapporteur
<b>M. Jacques Joyard</b> , Directeur de Recherche, CNRS CEA Grenoble	Rapporteur
<b>M. Claude Grignon</b> , Professeur, Agro-M Montpellier	Président du jury
<b>M. Thierry Simonneau</b> , Chargé de recherche, INRA Montpellier	Examinateur
<b>M. Alain Vavasseur</b> , Directeur de Recherche, CEA Cadarache	Examinateur
<b>M. Jean-Baptiste Thibaud</b> , Directeur de Recherche, CNRS Montpellier	Directeur de thèse

## Remerciements

Tout d'abord, merci à tous les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse ainsi que de s'être déplacés pour ma soutenance.

Un grand merci à mes deux chefs Jean-Baptiste et Hervé. Vous dire que votre aide a été importante quant à l'accomplissement de ma thèse serait bien loin de la vérité. A votre contact j'ai appris bien plus que simplement « faire de la recherche », et je ne saurais jamais suffisamment vous remercier du soutien autant intellectuel que personnel que vous m'avez prodigué tout au long de ma présence au laboratoire. Il y a eu des moments joyeux et des moments où j'aurais préféré ne pas être confronté à votre jugement, mais les conseils douloureux sont souvent les plus utiles et les plus justes, alors, encore un grand merci même pour ces moments là, voire, surtout pour ces moments.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude aux personnes avec lesquelles j'ai pu collaborer au cours de ces trois ans, Thierry Simmoneau, Alain Vavasseur, Laurent Torregrossa, Charles Romieu, toutes les discussions dans les caves du LEPSE, au CEA de Cadarache et à la cantine sur les différentes visions que l'on peut porter sur la biologie m'ont énormément apporté quant à la compréhension de ce qui est pompeusement appelé la « biologie intégrative » ainsi que sur l'importance de ne pas se focaliser sur les modes et modèles en biologie.

Un énorme merci à toutes les personnes de l'équipe qui malgré mon caractère un peu trop « Marseillais » ont toujours été là. Donc merci Nonor pour toutes ces discussions autour du poste d'électrophy, qu'elles aient été scientifiques ou pas, merci à Raphou et Claire d'avoir été de si gentils co-bureau et aussi merci à vous tous, Isabelle, Sabine, Carine, Karine, Geoffrey, Jérôme, etc...

Elargissons encore un peu cette pléiade de remerciements pour faire un petit clin d'œil à toutes les personnes du laboratoire pour leurs aides incessantes concernant des papiers administratifs, des commandes « extrêmement urgentes », des manips irréalisables, des coups de gueules à faire passer ou tout simplement pour discuter de tout et de rien.

Il ne faut absolument pas que j'oublie de saluer les redacteurs d'une des future plus grande revue neo-philosophico-scientifique, je parle bien sur du *Toward*.

Enfin, rien de tout cela n'aurait été possible sans vous, membres de ma famille, amis et surtout toi nanou... .

Encore un gigantesque **merci** à tous...

<b>I.- INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
I.1.- Le potassium dans la cellule.....	10
I.2.- Physiologie générale des transports de potassium dans la plante .....	11
I.2.1.- Absorption racinaire .....	12
Transport actif saturable (haute affinité) de K <sup>+</sup> .....	12
Transport passif de K <sup>+</sup> (faible affinité).....	14
I.2.2.- Traversée radiale de la racine.....	14
I.2.3.- Charge du xylème .....	16
I.2.4.- Charge et décharge du phloème.....	16
I.2.5.- Un schéma de la distribution de K <sup>+</sup> dans la plante.....	18
I.3.- La cellule de garde .....	19
I.3.1.- Principe des mouvements stomatiques.....	20
I.3.2.- Les osmotica des cellules de garde .....	20
Les sucres .....	20
Le potassium .....	21
Les contre-ions du potassium.....	21
I.3.3.- Les systèmes de transport ionique de la membrane plasmique.....	21
Les conductances potassiques.....	21
Les conductances anioniques .....	23
ATPases pompe à H <sup>+</sup> .....	23
I.3.4.- Les conductances tonoplastiques .....	23
Les canaux cationiques .....	24
Les canaux anioniques .....	24
I.3.5.- Schéma des mécanismes d'ouverture stomatique (Fig. I.7 A) .....	24
I.3.6.- Schéma des mécanismes de fermeture stomatique (Fig. I.7 B).....	25
I.3.7.- Réponse des stomates aux signaux environnementaux et hormonaux ...	27
Réponse à la lumière.....	27
Réponse au CO <sub>2</sub> .....	27
L'auxine .....	27
La demande évaporative .....	28
L'ABA.....	29
I.4.- Un modèle d'organe puits : la baie de raisin .....	30
I.4.1.- Contexte agronomique et biologique de l'étude .....	30
La vigne .....	31

La baie de raisin .....	31
I.4.2.- Développement de la baie de raisin (Fig. I.11).....	32
Le stade herbacé.....	33
La véraison .....	33
Le mûrissement .....	33
I.4.3.- Aspects physiologiques et biochimiques de la maturation des baies.....	35
Ramollissement des baies : modifications pariétales.....	35
Modifications du système vasculaire xylémien et de l'apport des solutés vers la baie .....	35
I.4.4.- Flux d'acides organiques.....	35
Acidité de la baie .....	35
Flux de sucres .....	36
I.4.5.- Le potassium dans les baies .....	37
Répartition du potassium dans les baies .....	37
Origine du potassium des baies .....	37
Interactions du potassium avec les composants de la baie .....	37
I.5.- Les canaux de type Shaker .....	38
Structure générale des canaux shaker végétaux.....	39
Le domaine pore.....	40
Le senseur de voltage .....	42
I.5.1.- Rôle des canaux Shaker chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	42
Rôle des différents canaux de type Shaker (Fig. I.15).....	44
I.6.- Contenu du mémoire .....	46
<b>II.- MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>47</b>
II.1.- Matériel végétal, conditions et milieux de culture .....	48
II.1.1.- Culture d' <i>Arabidopsis</i> sur terreau.....	48
II.1.2.- Culture d' <i>Arabidopsis</i> en milieu hydroponique .....	48
II.1.3.- Culture d' <i>Arabidopsis</i> en pots individuels.....	48
II.1.4.- Culture d' <i>Arabidopsis</i> sur vermiculite .....	49
II.1.5.- Culture du tabac.....	49
II.1.6.- Culture de la vigne .....	49
II.2.- Analyse physiologique .....	49
II.2.1.- Etude des pertes d'eau sur rosettes excisées ( <i>Arabidopsis</i> ).....	49
II.2.2.- Mesure de l'ouverture stomatique ( <i>Arabidopsis</i> ) .....	49

II.2.3.- Mesures des échanges gazeux et hydriques ( <i>Arabidopsis</i> ) .....	50
II.2.4.- Mesures des cinétiques d'ouverture et de fermeture stomatique ( <i>Arabidopsis</i> ) .....	51
II.2.5.- Mesure de la transpiration nocturne et diurne ( <i>Arabidopsis</i> ) .....	51
II.2.6.- Suivi de la véraison ( <i>Vitis</i> ) .....	52
II.2.7.- Suivi de la croissance des baies de raisins ( <i>Vitis</i> ) .....	52
II.2.8.- Titration acide et dosage en potassium du moût de raisin ( <i>Vitis</i> ) .....	53
II.2.9.- Dosage du potassium et des acides organiques ( <i>Vitis</i> ) .....	53
II.3.- Electrophysiologie .....	53
II.3.1.- Obtention des protoplastes de cellules de garde ( <i>Arabidopsis</i> ) .....	53
Protocole 1 : .....	54
Protocole 2 : .....	54
II.3.2.- Obtention des protoplastes de tabac .....	55
II.3.3.- Transformation des protoplastes de tabac .....	55
II.3.4.- Electrophysiologie sur protoplastes .....	55
Electrodes de mesure .....	55
Obtention du scellement de la pipette à la cellule .....	56
Configuration cellule entière .....	56
Solutions utilisées pour les enregistrements .....	57
Acquisition et l'analyse des signaux .....	58
II.3.5.- Protocoles d'enregistrement .....	58
Protocole à deux phases .....	58
Protocole de queue .....	58
II.4.- Obtention de plantes d' <i>Arabidopsis</i> transgéniques .....	61
II.4.1.- Transformation des plantes d' <i>Arabidopsis</i> .....	61
II.4.2.- Constructions utilisées .....	61
II.4.3.- Préparation d'agrobactéries compétentes .....	61
II.4.4.- Transformation des agrobactéries compétentes .....	61
II.4.5.- Transformation des plantes d' <i>Arabidopsis</i> par infiltration selon la méthode de Clough et Bent (1998) .....	61
II.4.6.- Stérilisation des graines d' <i>Arabidopsis</i> et sélection des lignées homozygotes .....	62
II.5.- Biologie Moléculaire .....	62
II.5.1.- Southern .....	62

Extraction d'ADN génomique.....	62
Digestion de l'ADN génomique.....	63
Transfert des fragments d'ADN sur une membrane de nylon.....	63
Hybridation de la membrane.....	63
II.5.2.- Extraction d'ARN.....	64
II.5.3.- Reverse transcription .....	64
II.5.4.- Amplification par PCR .....	64
<b>III.- RESULTATS.....</b>	<b>66</b>
III.1.- Rôle du canal GORK dans la régulation des mouvements stomatiques et de la transpiration des plantes.....	67
III.1.1.- Présentation de l'article 1 : .....	67
III.2.- Mise au point d'un système hétérologue végétal permettant la caractérisation de canaux ioniques.....	76
III.2.1.- Présentation de l'article 2 .....	76
Utilité des systèmes d'expression hétérologue .....	76
Les cellules mésophylliennes de tabac comme nouveau système d'expression hétérologue?.....	76
Une méthode d'utilisation des protoplastes de mésophylle de tabac pour l'expression hétérologue : localisation subcellulaire et patch-clamp .....	77
III.3.- Rôle de la sous unité silencieuse AtKC1 dans l'adaptation des plantes aux forts taux d'humidité de l'air .....	93
III.3.1.- Présentation de l'article 3 .....	93
III.4.- Caractérisation d'un nouveau canal potassique Shaker exprimé dans la baie de raisin.....	116
III.4.1.- Présentation de l'article 4 .....	116
<b>IV.- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>138</b>
<b>V.- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>142</b>

## I.- INTRODUCTION

## I.1.- Le potassium dans la cellule

Le potassium est le 7<sup>ème</sup> élément le plus abondant sur Terre et représente environ 1.5% de la masse totale de la planète. Les caractéristiques atomiques de ce métal alcalin (rapport charge/taille relativement faible comparé au sodium, Fig. I.1 A) font que son énergie d'ionisation est faible (il se trouve majoritairement sous forme ionique, Fig. I.1 B) et que le champ électromagnétique autour de l'ion est peu intense. Cela entraîne une coque d'hydratation de petite taille, et une faible tendance à modifier la structure de l'eau au delà de cette coque (faible pouvoir "chaotropique").

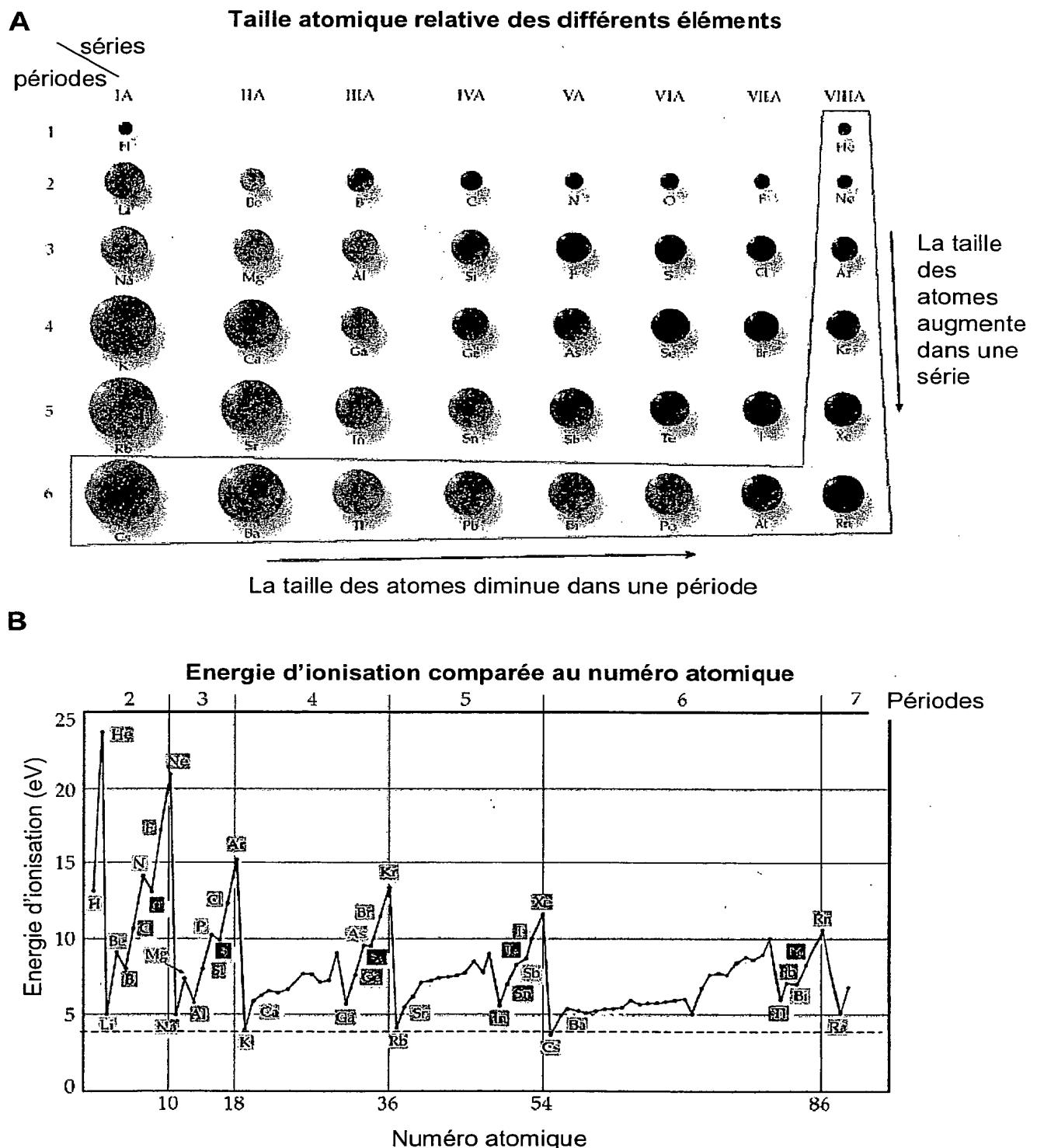
Ces propriétés sont compatibles avec le maintien de l'intégrité de la conformation des protéines lors d'une forte concentration en potassium (Franks and Eagland, 1975) qui, chez toutes les espèces vivantes, est le cation inorganique majoritaire du cytoplasme des cellules. Le potassium peut représenter jusqu'à 10% de la masse de la matière sèche d'une plante (leigh and Wyn Jones, 1984).

Les molécules organiques (protéines, acides organiques, acides nucléiques, etc.) comportent environ 25 fois plus d'oxygène (générant des groupements négatifs hydroxyles et phosphates) que d'azote (générant des groupements positifs amines) entraînant à pH physiologique, une charge globale négative (Lehninger, 1970). Ces charges négatives sont neutralisées par le potassium dont la concentration cytoplasmique peut atteindre 100 mM. Le potassium est par conséquent le principal déterminant de la force ionique du cytosol et de l'intensité des interactions électrostatiques inter- et intra-moléculaires déterminant la structure et l'activité des complexes enzymatiques.

La concentration de K<sup>+</sup> étant aux alentours de 100 mM dans le cytoplasme, et de quelques mM ou centaines de μM dans l'apoplasm, le potassium est le seul ion dont le potentiel d'équilibre (potentiel de Nernst, noté  $E_K$ , le plus souvent compris entre -120 et -50 mV) est situé au milieu de la gamme physiologique des valeurs pouvant être atteintes par le potentiel de membrane ( $E_m$ ). Donc cet ion est le seul à pouvoir entrer et sortir de la cellule en fonction de  $E_m$  par transport passif à travers des canaux qui sont les systèmes de transport ionique à plus forte conductance.

L'accumulation d'un cation diffusible comme K<sup>+</sup> pour neutraliser des anions indiffusibles comme les macromolécules organiques a pour conséquence l'apparition d'un "potentiel électrique de diffusion" qui est la composante principale du potentiel de repos des cellules. La conductance potassique étant la principale conductance membranaire, la compensation électrique du courant généré par l'activité des pompes électrogènes (notamment Na/K-ATPase des cellules animales et H<sup>+</sup>-ATPase des cellules végétales) se fait principalement par un courant potassique à travers des canaux sélectifs de K<sup>+</sup>. Ainsi, le potassium joue un rôle essentiel dans le contrôle du potentiel de membrane.

Enfin, l'accumulation du potassium dans la vacuole participe au contrôle de la pression osmotique des cellules qui, chez les plantes, est indispensable au maintien de la turgescence des tissus (Vorobiev, 1967; Maathuis and Sanders, 1993; Walker et al., 1996), à la croissance et aux mouvements cellulaires tels que l'ouverture et la fermeture stomatique (Raschke, 1979; MacRobbie, 1998), les nasties (Satter and Galston, 1981), ou l'expansion cellulaire (croissance du tube pollinique, (Mouline et al., 2002).



**Figure I.1.**

(A) Taille des différents atomes

(B) Valeur des énergies d'ionisation en fonction du numéro atomique de l'atome

## I.2.- Physiologie générale des transports de potassium dans la plante

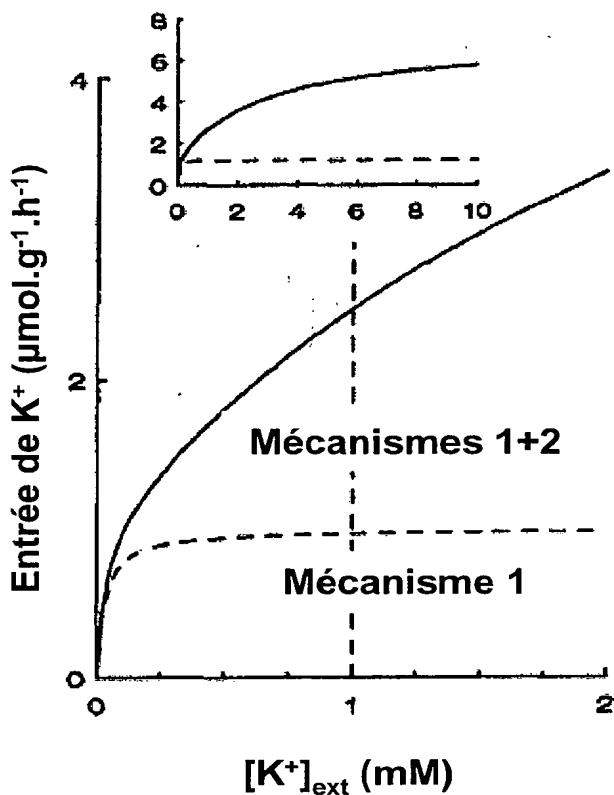
### **I.2.1.- Absorption racinaire**

Les plantes terrestres prélèvent le potassium dans la solution du sol par leurs racines. Ce prélèvement est important pour une plante en croissance puisqu'il doit représenter environ 10 % de l'accroissement de la masse sèche. La concentration de  $K^+$  dans la solution du sol dépend de la composition du substrat, de son hydratation ainsi que du pH, car un pH acide favorise la libération du potassium des sites anioniques du substrat minéral du sol. La concentration du potassium "libre" peut varier dans une gamme très large, la moyenne se trouvant entre 100 et 1000  $\mu M$ . Les plantes ont donc mis en place des modes de prélèvement du potassium dans le sol permettant leur développement sur la quasi totalité des sols, riches ou pauvres en potassium, avec ou sans autres cations concurrents (tel que le sodium). L'étude de l'absorption racinaire de  $K^+$  à l'aide de traceurs radioactifs,  $^{42}K^+$  ou  $^{86}Rb^+$ , a révélé les caractéristiques cinétiques des systèmes de transport impliqués dans cette absorption (Epstein et al., 1963). Une cinétique biphasique est observée en fonction de la concentration externe en potassium, et Epstein et ses collaborateurs postulent sur la présence de deux systèmes de transports distincts sur la membrane plasmique des cellules du cortex racinaire : un système de transport à haute affinité saturable ("mécanisme 1") et un système à basse affinité virtuellement non saturable ("mécanisme 2", Fig. I.2). L'absorption racinaire de  $K^+$ , qui est l'étape d'entrée de cet ion dans la plante, représente un modèle d'intégration de systèmes de transport ionique actif et passif, à haute et à faible affinité (au niveau de la membrane périphérique du symplasme cortical).

#### **Transport actif saturable (haute affinité) de $K^+$**

Des approches électrophysiologiques réalisées sur des protoplastes de cellules racinaires d'*Arabidopsis t.* ont montré qu'un courant potassique entrant (influx de  $K^+$ ) peut être enregistré dans des solutions de bain contenant quelques  $\mu$ moles de potassium par litre. Cet influx de potassium va contre le gradient électrochimique, et implique donc une énergisation du transport (Maathuis and Sanders, 1994). Deux types de systèmes de transport actif sont a priori envisageables : des systèmes à couplage secondaire (terminologie chimiosmotique selon Mitchell; Mitchell, 1961, 1967) catalysant le cotransport de  $K^+$  avec  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $H^+$ , ou un système couplant directement l'influx actif de  $K^+$  à l'hydrolyse d'ATP, c'est à dire une ATPase pompe à potassium.

Le potentiel de membrane des cellules du cortex racinaire ne dépend ni de la concentration en sodium ni de la concentration en calcium de la solution de bain, excluant donc un couplage entre l'influx (actif) de  $K^+$  et celui (passif) de  $Na^+$  ou de  $Ca^{2+}$ . Les courants potassiques n'étant pas modulés par une augmentation d'ATP cytoplasmique, l'intervention d'une pompe à  $K^+$  peut être exclue (Maathuis, 1996). Par contre, la variation du gradient de proton transmembranaire provoquée par des modifications du pH extérieur affecte les courants potassiques entrants (l'intensité du courant  $K^+$  entrant double lors d'une baisse de 2 unités du pH de la solution). Ces données suggèrent un couplage  $H^+/K^+$ , de plus, les modifications du potentiel de membrane lors de l'entrée de potassium, suivent les prévisions du modèle de Goldman-Hodgkin-Katz pour une stœchiométrie  $H^+:K^+$  de 1:1, suggérant que le



**Figure I.2.** Cinétique de l'absorption du potassium par les racines en fonction de la concentration extérieure en K<sup>+</sup>. L'entrée biphasique est catalysée par un mécanisme à haute affinité (mécanisme 1) et un mécanisme à faible affinité (mécanisme 2). L'insert montre le même modèle à une échelle plus large. Ligne en pointillée, mécanisme 1; ligne pleine, mécanisme 1+2.

système de transport à haute affinité permettant l'absorption racinaire du potassium est un symport  $H^+ : K^+$  (Maathuis, 1996).

Une famille de transporteurs ("KT" pour  $K^+$  Transporter) proche des transporteurs "KUP" ( $K^+$  Uptake) bactériens et "HAK" (High Affinity  $K^+$ ) des levures pourrait catalyser les flux racinaires de potassium. L'annotation du génome d'*Arabidopsis thaliana* révèle la présence une famille de 13 gènes codant des transporteurs KUP/HAK/KT dont le profil d'hydrophobicité suggère 12 segments transmembranaires. Il y a pour l'instant peu de données d'expression fonctionnelle et de localisation concernant ces gènes. Cependant 10 d'entre eux ont été détectés dans les poils absorbants, et une inhibition de l'activité de ces transporteurs suite à une alcalinisation du milieu a été rapportée (Senn et al., 2001; Ahn et al., 2004).

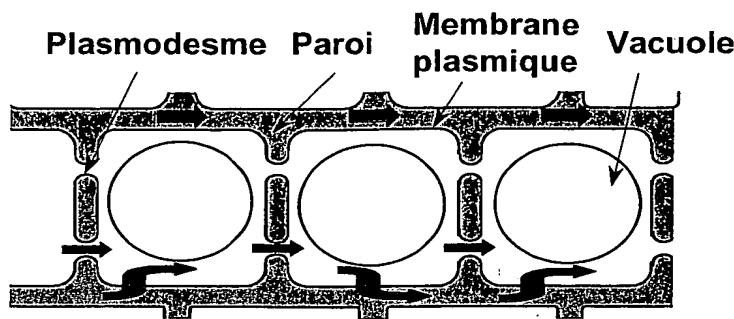
### **Transport passif de $K^+$ (faible affinité)**

Des canaux, plus ou moins sélectifs de l'ion  $K^+$  sont impliqués dans ce transport qui ne se fait qu'en descendant le sens du gradient de potentiel électrochimique. Les études de patch-clamp sur des protoplastes de cellules racinaires ont effectivement révélé l'activité de canaux entrants et sortants, sélectifs de  $K^+$ , bloqués par le TEA (inhibiteur spécifique des canaux potassiques) et pour certains contrôlés par le potentiel de membrane (canaux "voltage-dépendants"). En ce qui concerne l'absorption racinaire, des "IRKs" (pour *inward rectifying K<sup>+</sup> channels*) ont été mis en évidence chez de nombreuses espèces végétales telles que le blé (Gassmann and Schroeder, 1994), le maïs (Roberts and Tester, 1995), *Arabidopsis* (Maathuis and Sanders, 1995). Ils s'activent dans une gamme de potentiels de membrane couramment observée sur la membrane des cellules racinaires, et ne se désactivent pas, permettant donc de soutenir de larges influx de potassium du sol vers la plante.

Des "ORKs" (pour *outward rectifying K<sup>+</sup> channels*) ont été identifiés sur la membrane des cellules des tissus périphériques racinaires (épiderme, cortex et poils absorbants; Ivashikina et al., 2001). Ces canaux pourraient être impliqués dans les échanges entre le symplasme racinaire et la solution apoplasmique qui l'imprègne et/ou dans le contrôle de la polarisation électrique du réseau symplasmique.

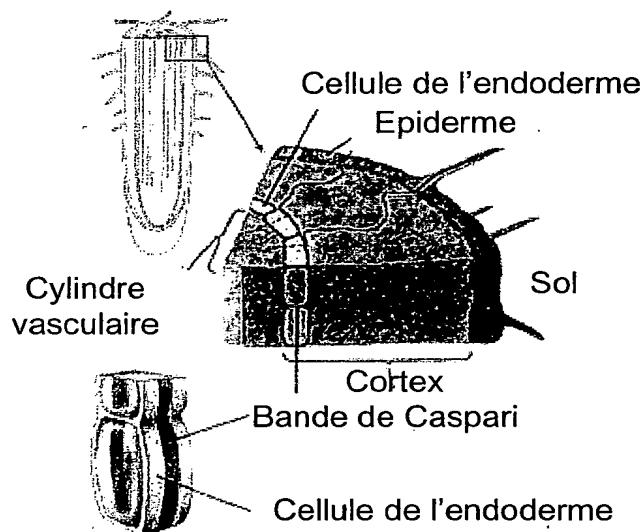
#### **1.2.2.- Traversée radiale de la racine**

Les ions et l'eau absorbés par les cellules épidermiques et corticales racinaires doivent traverser la racine puis entrer dans le xylème afin d'être transportés via le flux de sève brute jusque dans les organes aériens de la plante. Ce transfert radial vers la stèle racinaire peut emprunter deux voies différentes (Clarkson, 1993), la voie apoplasmique (voie extracellulaire), ou la voie symplasmique (voie intracellulaire, car les cellules de la racine sont reliées entre elles par de larges plasmodesmes; Fig. I.3 A). En règle générale, le potassium emprunte un trajet qui combine ces deux voies, mais la voie symplasmique est obligatoire pour franchir l'endoderme. Cette couche cellulaire qui entoure la stèle et dont la paroi est imprégnée de lignine et de subérine (bande de Caspary), forme une barrière entre l'apoplasm de la stèle et l'apoplasm cortical : la voie apoplasmique est interrompue au niveau de l'endoderme et les ions ne peuvent gagner la stèle que via la voie symplasmique (Fig. I.3 B). Ce passage obligé des ions par la voie intracellulaire implique l'activité de systèmes de transports ioniques membranaires ce qui permet de sélectionner spécifiquement les ions envoyés aux parties aériennes via le xylème.

**A**

**TRAJET:**  
apoplastique

**symplastique  
mixte**

**B**

### Figure I.3 Cheminement des ions (et de l'eau) du substrat vers la stèle

(A) Représentation des différentes voies empruntées par l'eau et les ions dans le cortex racinaire, en vert la voie apoplastique, en bleu la voie symplasmique et en rouge une voie mixte. (B) Représentation des différentes couches cellulaires de la racine, un agrandissement des cellules de l'endoderme est montré afin d'indiquer la bande de Caspary (en bas).

### **I.2.3.- Charge du xylème**

Dans la stèle, la voie symplasmique corticale se poursuit par les cellules du péricycle et du parenchyme xylémien. Le xylème lui-même est constitué des squelettes pariétaux de cellules mortes reliés longitudinalement entre eux par des ponctuations (anciens plasmodesmes; Clegg and Cox, 1978; Fig. I.4 A). Les vaisseaux xylémiens constitués par ces enchaînements de cellules mortes et à travers lesquels circule la sève brute, sont chargés par diffusion à partir de la solution qui imprègne leur apoplasm. La charge du xylème est donc contrôlée par les systèmes de transport qui catalysent l'efflux des ions depuis les cellules du parenchyme xylémien, une étape de franchissement membranaire qui soumet les ions à une nouvelle étape de sélection. Une fois dans le lumen du xylème, les ions sont entraînés par le flux de la sève brute qui résulte de trois mécanismes distincts (Zimmermann et al., 1994). L'évapotranspiration (ce flux d'eau au niveau des feuilles crée une tension sur la colonne d'eau du xylème, et permet son ascension par effet de succion) la poussée racinaire et la capillarité.

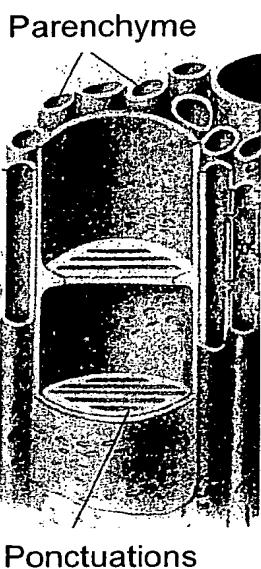
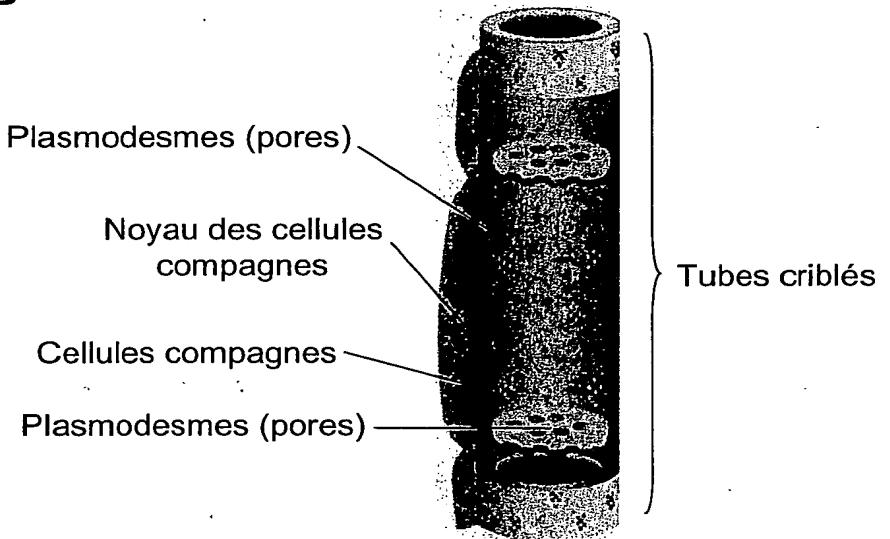
Des études électrophysiologiques réalisées sur des protoplastes de cellules du parenchyme xylémien de maïs, d'orge et d'*Arabidopsis* (Wegner and Raschke, 1994; Roberts and Tester, 1995b; Wegner and De Boer, 1997; Roberts, 1998; Diatloff et al., 2004) ont révélé la présence de deux conductances potassiques distinctes. Une conductance entrante, qui impliquent des "IRKs" semblables à ceux décrits ci-dessus dans les tissus périphériques et responsables de l'entrée de  $K^+$  dans le symplasme. Cette conductance permettrait une recapture du potassium apoplasmique en excès. Et une conductance sortante, impliquant des ORKs qui contrôleraient le relargage de potassium du symplasme racinaire vers l'apoplasm stellaire (vaisseaux du xylème).

### **I.2.4.- Charge et décharge du phloème**

La croissance et le développement de la plante nécessite une distribution des produits de la photosynthèse : ces molécules synthétisées dans les organes dits "sources" (feuilles matures) doivent ensuite être relocalisées vers les organes en croissance et les tissus non photosynthétiques de la plante (organes dits "puits", jeunes feuilles, fleurs, graines, fruits, racines). Cette relocalisation nécessite un transport sélectif à longue distance, qui est assuré par le système phloémien.

La charge et la décharge du phloème se fait grâce à des gradients osmotiques (et donc hydriques) créés entre les organes sources (fortes concentrations en sucres et en ions) et les organes puits (plus faibles concentrations, et donc plus fort potentiel osmotique; Vreugdenhil, 1985; Patrick, 1997). Le gradient osmotique est initialisé au niveau des organes sources par la création d'un potentiel électrochimique dû à l'activité des  $H^+$ -ATPases des cellules compagnes qui sont en contact électrique direct avec les cellules des tubes criblés (formant les vaisseaux du phloème) via des plasmodesmes (DeWitt et al., 1991; DeWitt and Sussman, 1995); fig. I.4 B). Cette énergisation de la membrane est essentielle à la création de flux de sucres (essentiellement de saccharose) et de potassium.

La caractérisation électrophysiologique des conductances potassiques des cellules phloémiennes n'est que peu documentée à cause de la difficulté d'obtention de protoplastes. Cette difficulté est moindre avec les racines de maïs dont la stèle est facile à séparer du cortex. Des cellules phloémiennes peuvent ensuite être obtenues par dissection. Sur ce matériel, des conductances potassiques ont été identifiées, elles sont proches des IRKs au niveau de leur sélectivité et de leurs réponses aux inhibiteurs, mais elles présentent une faible rectification, c'est à dire

**A****B**

**Figure I.4 : Représentation des vaisseaux conducteurs (xylème et phloème)**

(A) Les tubes xylémiens sont constitués des squelettes pariétaux de cellules mortes, séparés par des ponctuations (anciens plasmodesmes).

(B) Les tubes criblés sont constitués de cellules vivantes dont le noyau et les organites ont dégénéré, les protéines nécessaires à leurs fonctionnement leur sont délivrées par les cellules compagnes les entourant.

qu'elles permettent une entrée ou une sortie de potassium selon la valeur du potentiel de membrane (Bauer et al., 2000). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'utilisation de plantes

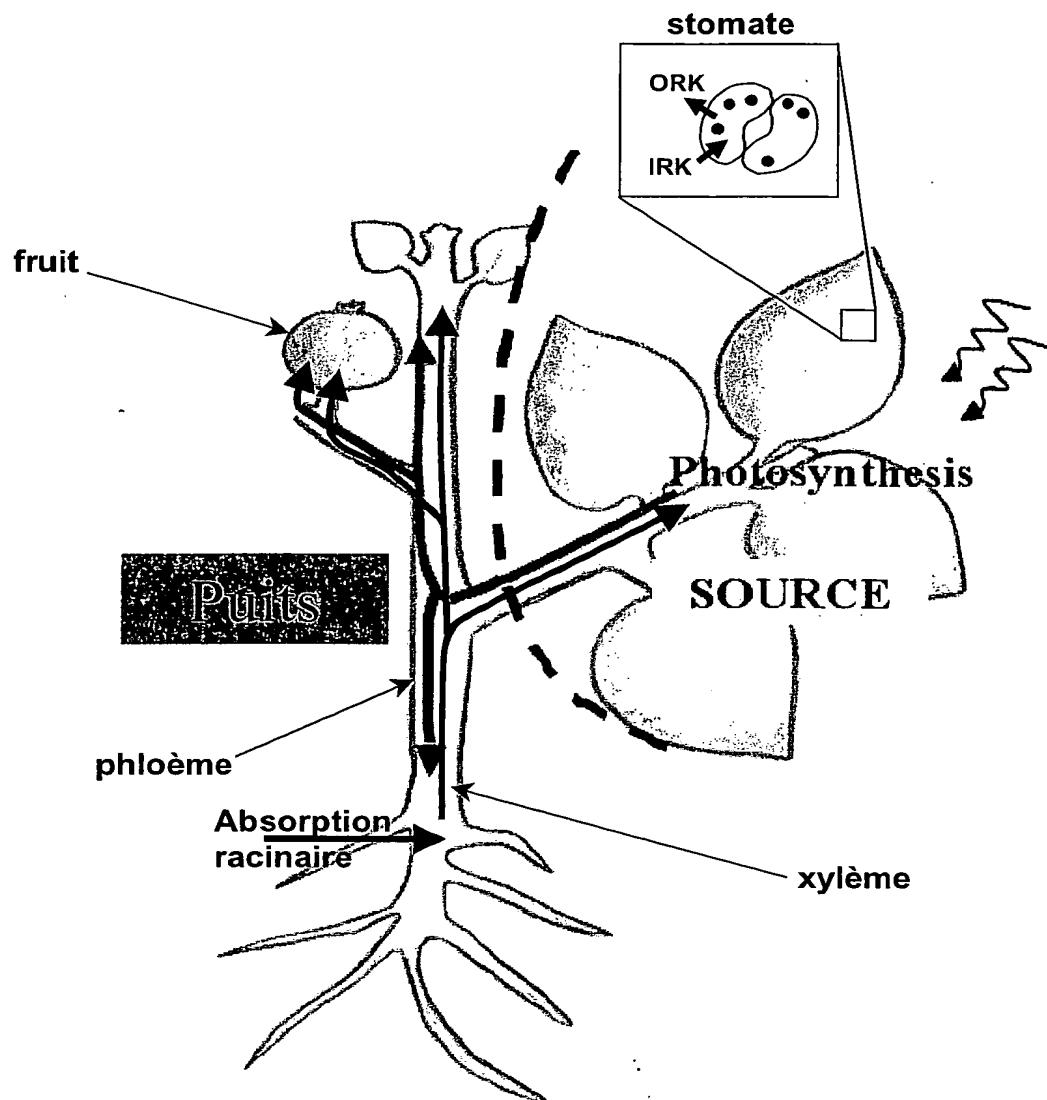
exprimant le gène de la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *AtSUC2* (actif spécifiquement dans les cellules compagnes phloémiennes), a permis d'isoler des protoplastes de ces cellules et d'identifier deux conductances potassiques : une conductance sortante de type ORK et une conductance entrante de type IRK (Ivashikina et al., 2003). Cependant, des conductances qui seraient éventuellement spécifiques aux cellules situées soit dans les régions sources soit dans les régions puits n'ont encore pu être mises en évidence.

Ces flux de potassium via le phloème ont trois fonctions essentielles, ils permettent (i) de contrôler le potentiel de membrane, tendant à rapprocher sa valeur de celle du potentiel d'équilibre de  $K^+$  ( $E_K$ ), (ii) de créer une partie du gradient osmotique responsable du flux de sève entre les organes sources et puits, et (iii) de contribuer à l'alimentation des organes puits (notamment les graines et les fruits) en potassium. Relativement au potassium, le terme de puits renvoie à deux types d'organes : les organes en croissance, qui nécessitent du potassium afin d'avoir une turgescence suffisante pour permettre l'expansion cellulaire, et les organes de "stockage" (puits stricto sensu) comme les tubercules, les graines et les fruits.

#### ***I.2.5.- Un schéma de la distribution de $K^+$ dans la plante***

L'absorption racinaire, la charge du xylème, le transfert vers les parties aériennes, et la redistribution via le phloème déterminent un schéma de circulation du potassium dans la plante (figure I.5). Ce schéma met en exergue deux aspects des transports et des rôles du potassium dans la plante sur lesquels ont porté mes travaux de recherche : les mouvements stomatiques qui impliquent notamment des flux intenses et rapides de  $K^+$  à travers le plasmalemme et le transfert source-puits de  $K^+$  qui est déterminant, par exemple, dans le développement des fruits.

Un aperçu des connaissances relatives aux mécanismes des mouvements stomatiques est donné ci-dessous dans le paragraphe I.3. Le modèle de puits sur lequel j'ai travaillé, la baie de raisin, est présenté dans le paragraphe I.4.



**Figure I.5. Circulation du potassium dans la plante.**

L'entrée de potassium se fait au niveau de la racine, puis il est chargé dans le xylème ou il est distribué dans toute la plante ou il intervient dans de nombreux mécanismes cellulaires comme le contrôle des mouvements stomatiques. Lors de la fructification, d'importantes quantités de potassium vont être transférées via le phloème dans les fruits, modèle d'organes puits.

### I.3.- La cellule de garde

Chez les plantes supérieures (pré-spermaphytes et spermaphytes), l'essentiel des échanges gazeux entre les parties aériennes et l'atmosphère (perte de vapeur d'eau,

capture de CO<sub>2</sub> et de O<sub>2</sub> pour la photosynthèse et la respiration) s'effectue à travers les stomates, présents au niveau de l'épiderme de ces organes aériens. Un stoma est constitué de deux cellules réniformes, dont la courbure délimite un pore ou ostiole à travers lequel diffuse la vapeur d'eau et le CO<sub>2</sub> (Zeiger, 1983; Blatt, 2000a; Hetherington, 2001). Ces échanges se font entre l'atmosphère et la chambre sous-stomatique, cavité bordée de cellules mésophylliennes, située sous le stoma et dans laquelle débouche le réseau de méats foliaires. La répartition des stomates varie en fonction des espèces, elle peut être identique entre les deux faces de la feuille, ou être exclusive de la face inférieure (moins soumise au vent). La densité des stomates peut être comprise entre 30 et 300 stomates par mm<sup>2</sup>. La moyenne des ouvertures stomatiques détermine l'intensité des échanges gazeux à l'échelle d'une feuille. Tous les stomates d'une même feuille n'ont pas le même degré d'ouverture, au contraire, la feuille est une sorte de patchwork, avec des zones où les stomates sont plus ouverts que dans d'autres zones. Cette hétérogénéité d'ouverture pourrait dépendre des micro-conditions internes et externes de chaque zone (Mott and Buckley, 2000). Le degré d'ouverture des stomates dépend du bilan des pressions s'exerçant sur la paroi des cellules de garde, de la pression de turgescence à l'intérieur de la cellule et de la pression des cellules voisines (cellules épidermiques; Franks et al., 1998; Mott and Franks, 2001). La régulation de l'ouverture stomatique nécessite l'intégration par la plante d'un grand nombre de paramètres physiologiques et environnementaux afin de gérer la contradiction entre la nécessité d'avoir une grande surface d'échange pour capter le CO<sub>2</sub> servant à la photosynthèse et celle d'économiser de l'eau afin d'éviter la déshydratation.

### ***I.3.1.- Principe des mouvements stomatiques***

Les mouvements stomatiques sont dus à des déformations mécaniques des cellules de garde sous l'influence de variations de la pression osmotique intracellulaire. Les parois des deux cellules de garde étant d'une part soudées l'une à l'autre à leurs extrémités, et d'autre part, plus épaisses et moins déformables en regard de l'ostiole, la déformation mécanique mène à une ouverture du pore stomatique.

Lors de l'ouverture (la fermeture) stomatique, l'augmentation (la diminution) de la concentration intracellulaire en solutés s'accompagne d'un influx (efflux) d'eau responsable d'une augmentation (diminution) de la turgescence des cellules de garde. Les solutés majoritaires impliqués dans ces mouvements stomatiques sont les sucres, le potassium, le malate, le nitrate et le chlore.

### ***I.3.2.- Les osmotica des cellules de garde***

#### ***Les sucres***

La contribution des sucres en tant qu'osmotica impliqués dans l'ouverture des stomates dépend de la période de la journée. Les sucres sont peu présents pendant les premières heures de jour, mais deviennent les osmotica majeurs de l'ouverture ainsi que du maintien de celle-ci au cours de la journée. Trois sucres différents interviennent majoritairement dans les mouvements stomatiques, et la proportion de l'un par rapport aux autres varie en fonction de la qualité de la lumière. Le saccharose intervient dans la quasi totalité des réponses lumineuses, il est issu soit de la photosynthèse des cellules de garde ou des cellules mésophylliennes avoisinantes (Lu et al., 1995), soit de la dégradation de l'amidon. Le maltose et le maltotriose sont quand à eux directement issu de la dégradation de l'amidon, et ne semblent intervenir que suite à une induction de l'ouverture par de la lumière bleue (Talbott and Zeiger, 1993; Talbott and Zeiger, 1998).

## ***Le potassium***

L'importance du potassium dans les mouvements stomatiques a été découverte dans les années 60 (Fischer and Hsiao, 1968). Depuis, il a été démontré que l'ouverture stomatique matinale (en début de photopériode) repose essentiellement sur une entrée de potassium (Tallman and Zeiger, 1988), et que le rôle des sucres n'apparaît qu'une fois le stomate ouvert. Même si les cellules ont la capacité de soutenir un important efflux de potassium, et que expérimentalement l'induction de cet efflux entraîne la fermeture du stomate, le rôle de  $K^+$  dans la fermeture stomatique à la tombée de la nuit n'a pas été clairement démontré, car la concentration en potassium dans les cellules de garde baisse tout au long de la journée, jusqu'à ne plus représenter l'osmoticum majoritaire (Talbott and Zeiger, 1996).

### ***Les contre-ions du potassium***

Les flux de  $K^+$  doivent être suivis d'une accumulation équivalente de charge négative afin de respecter l'électroneutralité de la cellule. Deux formes de contre-ion ont été identifiées, des anions minéraux, directement prélevés dans le sol ( $Cl^-$  et  $NO_3^-$ ) et des anions organiques (comme le malate issu de la dégradation de l'amidon et/ou de la photosynthèse). La part de chacun de ces anions dans les mouvements stomatiques dépend logiquement des conditions du milieu.

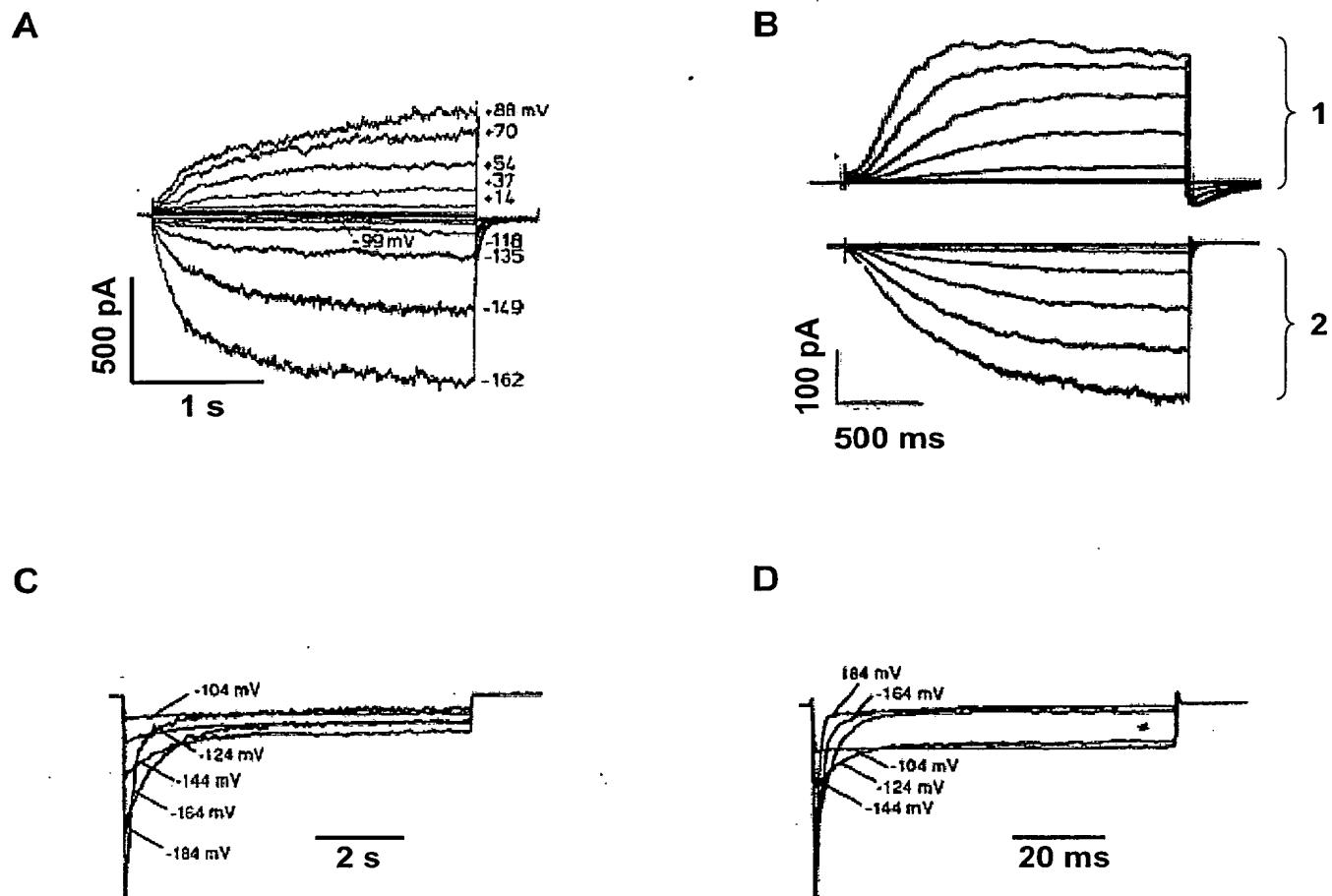
#### ***I.3.3.- Les systèmes de transport ionique de la membrane plasmique***

##### ***Les conductances potassiques***

Les cellules de garde possèdent des canaux potassiques entrants et sortants similaires à ceux observés dans les tissus racinaires (Fig. I.6 A et B). Ces canaux entrants ont une forte sélectivité pour  $K^+$ , ils s'activent lors de l'hyperpolarisation cellulaire, ne s'inactivent pas et sont inhibés par une élévation de la concentration cytoplasmique de  $Ca^{2+}$  (Schroeder et al., 1984; Schroeder et al., 1987; Blatt, 1988; Schroeder and Fang, 1991; Roelfsema and Prins, 1997).

Les canaux sortants de la cellule de garde sont activés par une dépolarisation et sont inhibés par une baisse de pH apoplasmique. Leurs potentiel d'activation suit le potentiel d'équilibre de  $K^+$ , c'est à dire qu'il varie en fonction de la concentration en potassium de l'apoplasm : une concentration élevée en potassium dans l'apoplasm entraîne un  $E_K$  peu négatif et donc l'activation des ORKs requiert une forte dépolarisation (Schroeder et al., 1984; Schroeder et al., 1987; Blatt, 1988; Hosoi et al., 1988; Schroeder and Fang, 1991; Roelfsema and Prins, 1997).

Ces propriétés des IRKs et ORKs de la cellule de garde les désignent *a priori* comme des pièces essentielles des mécanismes d'ouverture et de fermeture du stomate.



**Figure I.6. Conductances membranaires de la cellule de garde**

(A) Courants potassiques enregistrés par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière sur cellule de garde de *Vicia f.* sur une gamme de potentiels de membrane allant de +88mV à -162 mV. (B) Décomposition des courants potassiques sortants (1) et entrants (2) présents sur la cellule de garde d'*Arabidopsis t.* (C et D) Courants anioniques de type S et de type R respectivement enregistrés sur la membrane de *Vicia f.*

### **Les conductances anioniques**

Comme les canaux potassiques, les canaux anioniques des cellules de garde contribuent à deux fonctions physiologiques essentielles, la régulation de la turgescence cellulaire (Keller et al., 1989; Schroeder and Hagiwara, 1989; Guo et al., 2003), et le contrôle du potentiel de membrane. En effet, le potentiel d'inversion du chlore étant proche de 0 mV, l'ouverture des conductances anioniques va engendrer un efflux d'anion et une importante dépolarisation de la membrane. Deux types majoritaires de canaux anioniques ont été identifiés à ce jour sur la membrane plasmique des cellules de garde, les canaux de type S (pour slow; Fig. I.6 C), et de type R (pour rapid), également appelé GCAC1 pour Guard Cell Anionic Channel 1 (Keller et al., 1989; Schroeder and Hagiwara, 1989; Fig. I.6 D).

Les canaux anioniques de type R s'activent quasiment instantanément suite à une dépolarisation (en quelques  $10^{-2}$  s), et s'inactivent spontanément (Keller et al., 1989; Hedrich et al., 1990; Marten et al., 1991). Leur séquence de sélectivité est  $\text{NO}_3^- > \text{Cl}^- >$  malate. Ces canaux activés par l'ATP et le GTP ont une activité trop fugace pour catalyser les efflux d'anions observés pendant la fermeture stomatique, ils seraient plutôt impliqués dans l'ajustement du potentiel de membrane (Hedrich et al., 1990).

Les canaux de type S ont la même sélectivité que les canaux de type R et sont activés par une élévation du calcium cytoplasmique. Leur cinétique d'activation et de désactivation est lente : ces canaux permettent des efflux substantiels et une dépolarisation soutenue, facteurs essentiels de la fermeture stomatique (Marten et al., 1991; Linder and Raschke, 1992; Schroeder and Keller, 1992). Le blocage de ces canaux par ajout de NPPB, supprime la fermeture stomatique (Schroeder et al., 1993; Schwartz et al., 1995).

### **ATPases pompe à $H^+$**

Les cellules de garde possèdent des ATPases sécrétices de proton qui permettent l'énergisation de la membrane plasmique. L'activité électrogène de ces pompes a été observée sur des protoplastes de cellule de garde de *Vicia faba* où une stimulation lumineuse (signal provoquant l'ouverture stomatique) déclenche un courant hyperpolarisant dépendant de la concentration en ATP du cytosol (Assmann et al., 1985; Serrano, 1989). Ce courant pouvant être inhibé par le vanadate a été attribué à l'activité des ATPases de type P, c'est à dire, aux ATPases formant un intermédiaire phosphorylé lors de l'hydrolyse de l'ATP (Serrano, 1989).

L'hyperpolarisation générée par l'activité de ces pompes, rend le potentiel de membrane inférieur au potentiel d'équilibre de  $K^+$ , ce qui permet l'influx de  $K^+$  nécessaire à l'ouverture stomatique. Cet influx se fait principalement à travers les IRKs dont l'activité est favorisée par cette hyperpolarisation membranaire.

#### **I.3.4.- Les conductances tonoplastiques**

La vacuole occupe près de 90% du volume de la cellule de garde, elle est donc étroitement impliquée dans le contrôle de l'osmolarité. La quasi totalité des osmotica qui entrent dans la cellule via les transporteurs plasmalemmiques lors de l'ouverture stomatique, doivent entrer dans la vacuole et, inversement lors de la fermeture. C'est pour cela que la régulation des concentrations de solutés cytoplasmiques nécessite un haut degré de coordination entre les différents systèmes de transport plasmalemmiques et tonoplasmiques (MacRobbie, 1995; MacRobbie, 1999).

### **Les canaux cationiques**

Trois types de canaux sélectifs des cations ont été identifiés sur la membrane tonoplastique, les SV (slow vacuolar), les FV (Fast vacuolar), et les canaux VK (Vacuolar K<sup>+</sup> channel).

Les canaux SV s'activent lentement lors d'une augmentation de la concentration en calcium du cytosol, et permettent une sortie de cations de la vacuole vers le cytoplasme. Les courants qu'ils catalysent sont peu sélectifs, ces canaux sont en effet perméables aux cations monovalents et au calcium. Ces caractéristiques suggèrent que les canaux SV seraient impliqués dans les mécanismes de calcium induced/calculus release, qui est un élément essentiel des voies de régulation de la fermeture stomatique (Amodeo et al., 1994; Schulz-Lessdorf et al., 1994; Ward and Schroeder, 1994).

Les canaux FV ont une activation instantanée en réponse à un changement du potentiel de membrane vacuolaire. Contrairement aux canaux SV, ils sont inhibés par une forte concentration en calcium cytosolique (> 100 nM). Ces canaux sélectifs des ions monovalents pourraient jouer un rôle dans le relargage du potassium lors de la fermeture stomatique (Allen and Sanders, 1996).

Les canaux VK, les troisièmes canaux identifiés sur le tonoplaste, sont très sélectifs du potassium, et peu sensibles au potentiel de membrane. Leur activation est fortement liée à la concentration en calcium du cytoplasme, mais aussi au pH du cytoplasme (activité maximum pour un pH de 6.3). Ces canaux pourraient être eux aussi responsables de la purge de la vacuole en potassium lors de la fermeture stomatique (Ward and Schroeder, 1994; Allen et al., 1998).

### **Les canaux anioniques**

Très peu d'études ont été réalisées sur les canaux anioniques du tonoplaste des cellules de garde. Les seules données disponibles viennent d'autres types cellulaires, où des canaux perméables au malate et au chlore ont été identifiés (Pantoja et al., 1992; Ping et al., 1992; Cerana et al., 1995). Au niveau des cellules de garde, seul un canal de type VCL (Vacuolar Cl<sup>-</sup> channel) activé par une protéine kinase ayant un domaine de liaison à la calmoduline (CDPK: Calmoduline-like Domain Protein Kinase) a été identifié par patch-clamp (Pei et al., 1996). Les canaux VCL sont activés par la CDPK lors d'une augmentation de la concentration en calcium et en ATP cytosolique.

#### **I.3.5.- Schéma des mécanismes d'ouverture stomatique (Fig. I.7 A)**

La majorité des signaux (essentiellement la lumière et l'auxine) induisant l'ouverture stomatique, sont relayés par l'activation des pompes à proton de type P du plasmalemme (Assmann et al., 1985; Roelfsema et al., 2001). Le fonctionnement de ces pompes électrogènes permet une hyperpolarisation membranaire qui entraîne l'ouverture des canaux potassiques voltage dépendant entrants (IRK), menant à un influx de potassium dans le cytoplasme. Parallèlement, le gradient de potentiel électrochimique de H<sup>+</sup> créé par la pompe permet le fonctionnement de transporteurs anioniques assurant une entrée d'anions. Une autre réponse induite par la lumière est l'activation de la phosphoénol-pyruvate carboxylase et de la malate synthase, qui entraîne une accumulation de malate (Talbott and Zeiger, 1998; Asai et al., 2000; Outlaw and De Vlieghere-He, 2001). L'accumulation de l'ensemble de ces osmotica entraîne une entrée d'eau et donc une augmentation de la pression de turgescence, ce qui provoque l'ouverture du stomate.

### **I.3.6.- Schéma des mécanismes de fermeture stomatique (Fig. I.7 B)**

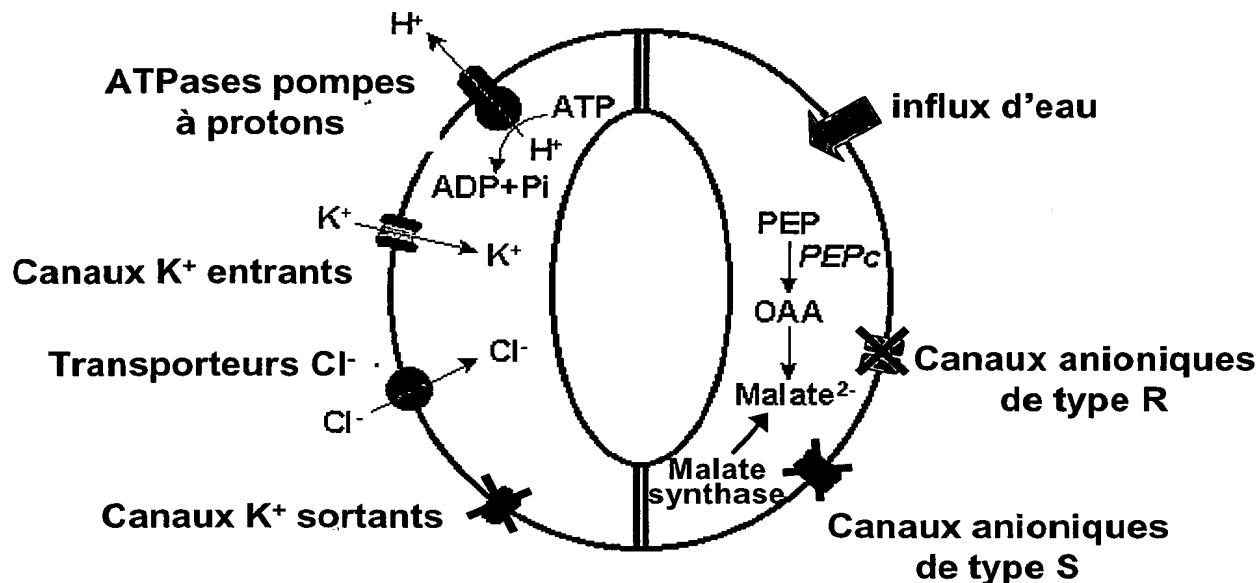
Les mécanismes responsables de la fermeture stomatique sont décrits de manière plus fine. Ils intègrent de nombreux stimuli extérieurs et intérieurs : changements de la qualité et de la quantité de lumière incidente, augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub>, variations des concentrations locales en phytohormones (ABA, acide jasmonique), changement du potentiel d'oxido-réduction (Assmann, 1993; MacRobbie, 1998; Assmann and Shimazaki, 1999; Blatt, 2000a; Hetherington, 2001; Schroeder et al., 2001; Chen and Gallie, 2004). L'ensemble des données disponibles concernant la transduction de ces différents signaux déclencheurs de la fermeture permet de distinguer deux phases. La première correspond à une série d'événements spécifiques de chaque stimulus, aboutissant, dans la grande majorité des cas, à une augmentation de la concentration en calcium cytoplasmique. La seconde phase, en aval du signal calcique, semble relativement indépendante de la nature du stimulus initial.

L'augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol résulte de l'activation des canaux calciques plasmalemmiques et vacuolaires, permettant à la fois une entrée de calcium à partir de l'apoplasmé et un relargage à partir des stocks intracellulaires (Gilroy et al., 1990; Schroeder and Hagiwara, 1990; Allen and Sanders, 1996; Allen et al., 2001; Allen and Schroeder, 2001; Evans et al., 2001). L'intégration locale des différents transports se traduit à la fois par une élévation rapide de la concentration de Ca<sup>2+</sup> et par des fluctuations (oscillations) de cette concentration au cours du temps dont la fréquence et l'amplitude pourraient constituer un signal qui déterminerait la taille du pore à l'état stationnaire (Allen et al., 2001).

Le signal calcique conduit à l'inactivation des pompes à proton, ainsi qu'à l'inhibition directe (Blatt, 2000a, b) ou indirecte *via* des réactions de phosphorylation-déphosphorylation (Pei et al., 1997) des conductances potassiques entrantes. En parallèle, l'augmentation du calcium cytosolique entraîne l'activation des deux types de conductances anioniques, S-type (Pei et al., 1997; Leonhardt et al., 2001) et R-type (Keller et al., 1989; Hedrich et al., 1990; Marten et al., 1991), responsables des efflux d'anions hors de la cellule de garde. L'ouverture des conductances anioniques provoque la dépolarisation membranaire (le potentiel de membrane tend vers le potentiel d'équilibre du chlore). Cette dépolarisation active des ORKs et provoque donc une sortie massive de potassium hors de la cellule. Un troisième effet du signal calcique est une alcalinisation du cytosol, qui active, elle aussi, les ORKs. L'efflux d'anions et de potassium entraîne une sortie d'eau et donc une diminution de la turgescence des cellules de garde conduisant à une fermeture du stomate.

L'essentiel des ions secrétés (environ 90%) provient de la vacuole. La mobilisation de ces ions vacuolaires est due à l'activation des canaux cationiques et anioniques tonoplastiques par le signal calcique cytosolique (Amodeo et al., 1994; Pei et al., 1996). La coordination des activités de transport sur les deux membranes permet de préserver l'homéostasie cytoplasmique.

A



B

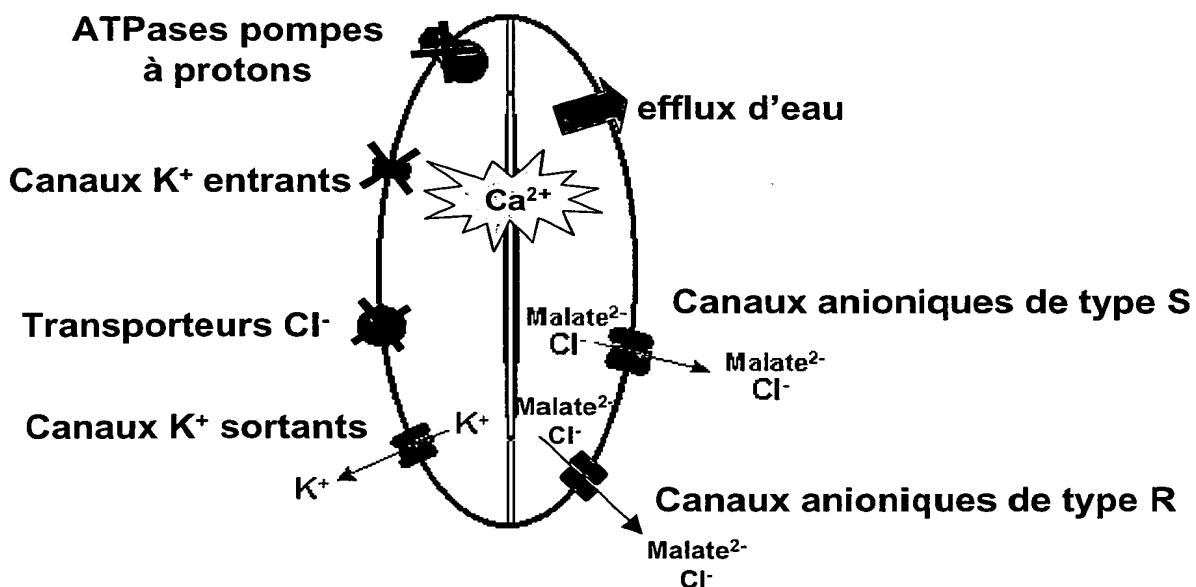
**Figure I.7.**

Schéma général des mécanismes menant à l'ouverture stomatique (A) ou la fermeture (B). Les croix représentent l'inaction des systèmes de transport.

### **I.3.7.- Réponse des stomates aux signaux environnementaux et hormonaux**

#### **Réponse à la lumière**

L'ouverture des stomates est nécessaire quand les plantes reçoivent un rayonnement exploitable par leurs photosystèmes, c'est à dire de la lumière bleue ou rouge.

L'ouverture des stomates en réponse à la lumière rouge ne se produit qu'en cas d'une forte intensité. En dépit du fait que de nombreux récepteurs de la lumière rouge aient été identifiés (5 gènes codent des phytochromes chez *Arabidopsis*), leurs rôles dans l'ouverture stomatique à la lumière rouge n'ont pas encore été démontrés. Ils semblent plutôt impliqués dans le phototropisme, et les mécanismes d'évitement des autres plantes. Un intense rayonnement de lumière rouge va provoquer la fixation du CO<sub>2</sub>, et donc diminuer la concentration de CO<sub>2</sub> dans la chambre sous stomatique. C'est la diminution de cette concentration qui semble activer par une voie encore inconnue l'ouverture stomatique, peut-être, entre autre par une accumulation de sucres issus de la photosynthèse (Roelfsema et al., 2002).

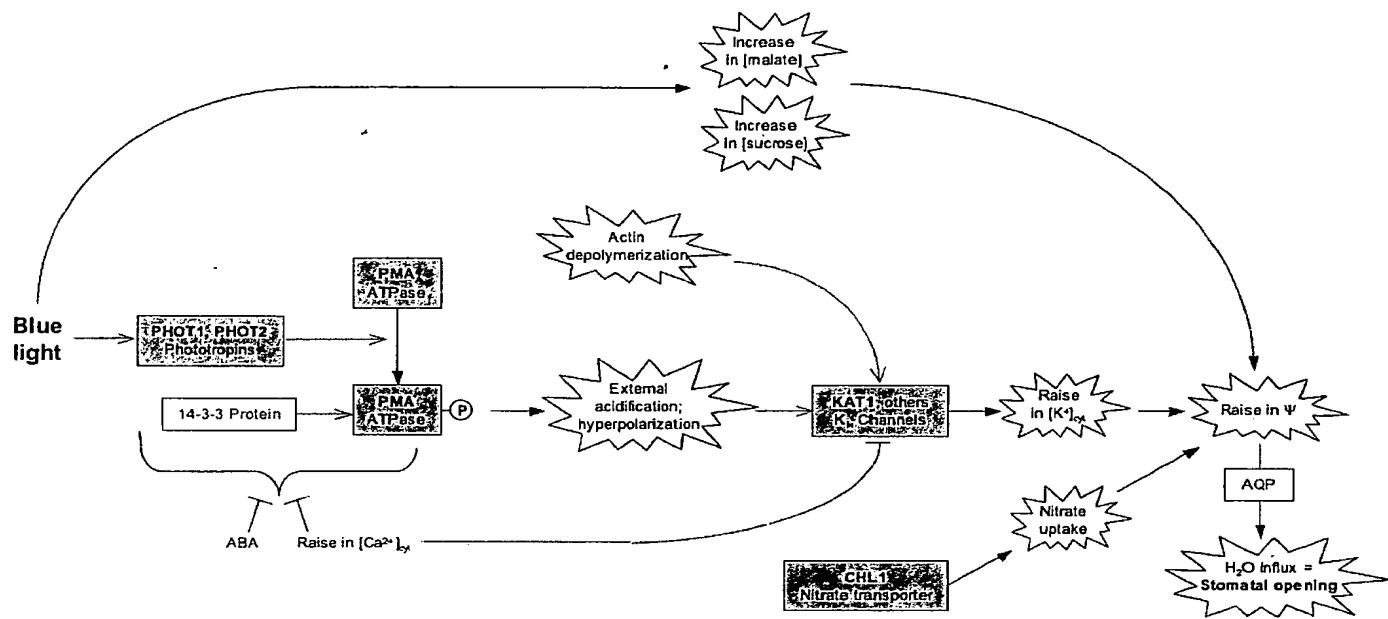
Une forte intensité de lumière bleue entraîne aussi une ouverture des stomates (Fig. I.8). Dans ce cas, les mécanismes d'ouverture pourraient être identiques à ceux entraînant l'ouverture sous forte lumière rouge. Mais, une intensité faible (non photosynthétique) de lumière bleue, correspondant aux premières lueurs du matin, engendre aussi des mouvements stomatiques. Cette réponse passe par l'activation des phototropines (Kinoshita et al., 2001). Les phototropines sont des Serine/thréonine kinases couplées à un chromophore (flavine) qui changent de conformation et s'autophosphorylent en présence de lumière bleue. Le phosphate est transféré sur la région cytoplasmique de la H<sup>+</sup>-ATPase du plasmalemme via une voie impliquant d'autres protéines kinases. La pompe à proton ainsi phosphorylée, fixe une protéine 14-3-3 qui la maintient sous sa forme activée, créant ainsi l'hyperpolarisation qui initie l'ouverture stomatique (Lin, 2002; Talbott et al., 2003).

#### **Réponse au CO<sub>2</sub>**

Les stomates répondent à la concentration en CO<sub>2</sub> des espaces intercellulaires du mésophylle plutôt qu'à la pression partielle de CO<sub>2</sub> de l'atmosphère (Mott, 1988; Assmann, 1999). Il semble que la plupart des modifications de l'ouverture stomatique en réponse aux variations de la concentration de CO<sub>2</sub> peut s'expliquer par les conséquences de ces variations sur la photosynthèse (Roelfsema et al., 2002).

#### **L'auxine**

Les données publiées sur les effets de l'auxine sont confuses car les effets de l'AIA sont différents de ceux des hormones de synthèse (Mansfield et al., 1990). Schématiquement, l'auxine active la pompe à proton plasmalemmique (Gehring et al., 1998; Baully et al., 2000), et des applications exogènes d'AIA affectent les IRKs (activation) et les ORKs (inhibition) de manière dose et pH dépendante et inhibent les courants anioniques (Marten et al., 1991; Thiel et al., 1993; Blatt and Thiel, 1994), le tout menant à une ouverture stomatique.



**Figure I.8. Voie de régulation de l'ouverture stomatique en réponse à la lumière bleue.**

### La demande évaporative

La demande évaporative, liée au VPD (vapor pressure deficiency) peut être définie comme la différence d'humidité relative entre la chambre sous-stomatique, et l'atmosphère. Si la demande évaporative est faible, une large ouverture stomatique permet d'absorber beaucoup de CO<sub>2</sub> avec une faible perte d'eau, par contre si la demande est forte, une ouverture réduite est nécessaire pour économiser de l'eau. Il semble que la plante perçoit plus la transpiration globale de la feuille, plutôt que le VPD (Mott and Parkhurst, 1991). Les mécanismes à la base de cette perception n'ont pas été identifiés, cependant trois hypothèses sont débattues. Soit il existe un senseur moléculaire de flux d'eau (à travers l'ostiole ou la cuticule), soit la déshydratation des cellules avoisinant le stomate, due à la trop forte évaporation, déclenche une fermeture, dans ce cas là il y aurait un senseur de teneur en eau ou de turgescence cellulaire, soit l'important flux de transpiration issu d'un VPD trop fort, mène à une accumulation rapide d'ABA au niveau des stomates, et donc entraîne leur fermeture. Une récente étude de Sarah Assmann sur la réponse de mutant insensible à l'ABA, et des mutants ne synthétisant pas d'ABA à l'humidité de l'air, a montré que les mutations n'affectaient pas la réponse des plantes au VPD, contredisant donc la troisième hypothèse citée ci-dessus (Assmann et al., 2000).

## L'ABA

Le rôle de l'ABA dans la régulation de la taille du pore stomatique de plantes soumises à un stress hydrique est très documenté. Par exemple, des mutants dans la voie de biosynthèse de l'ABA sont déficients dans le contrôle de leur ouverture stomatique en réponse à un stress hydrique (Koornneef et al., 1982; Leon-Kloosterziel et al., 1996; Marin et al., 1996). Cette hormone synthétisée essentiellement dans les racines soumises à un stress hydrique, déclenche, quand elle est ajoutée dans le milieu d'incubation d'épidermes pelés, un efflux de potassium et une fermeture stomatique (MacRobbie, 1998).

La réception par les stomates reste une étape inconnue de la voie de transduction du signal ABA. Certains avancent la présence de récepteurs à la face externe de la membrane plasmique (Anderson et al., 1994) et d'autres celle d'un récepteur cytoplasmique (Hamilton et al., 2000). Cependant, aucun récepteur n'a été identifié à ce jour.

En aval de la fixation de l'ABA sur son hypothétique récepteur, toute une cascade de transduction se met en place (Fig. I.9), faisant intervenir des réactions de phosphorylation et déphosphorylation (Armstrong et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Li et al., 2000; Merlot et al., 2001; MacRobbie, 2002; Mustilli et al., 2002), l'activation de protéines G (Wang et al., 2001; Assmann, 2002; Coursol et al., 2003; Pandey and Assmann, 2004) et la production de molécules telles que l'IP3, l'IP4 et l'IP6 (Gilroy et al., 1990; Staxen et al., 1999; Lemtiri-Chlieh et al., 2000; Jung et al., 2002), le cADPR (Leckie et al., 1998; Sanchez et al., 2004), les espèces réactives de l'oxygène (Pei et al., 2000; Kohler et al., 2003; Chen and Gallie, 2004), le NO (Garcia-Mata and Lamattina, 2001; Garcia-Mata et al., 2003; Garcia-Mata and Lamattina, 2003), des sphingolipides (Ng et al., 2001), etc.

Quelques acteurs moléculaires de cette cascade de transduction ont été identifiés, mais la place de chacun n'est pas encore définie. On connaît au moins deux voies de réponse à l'ABA : une réponse pH-dépendante et une réponse calcium-dépendante (Blatt, 2000b). La fermeture du stomate en réponse au méthyl jasmonate semble emprunter également une partie de ces voies (Suhita et al., 2004) démontrant ainsi une interconnexion entre les différents stimuli menant à la fermeture stomatique.

Une "protein kinase", nommée OST1 (pour open stomata 1), intervient spécifiquement en réponse à l'ABA, et en amont de toute la cascade de transduction décrite ci-dessus. Le criblage d'une banque de mutants d'insertion à l'aide d'une caméra infrarouge, qui permet de repérer des variants en termes de transpiration, a conduit à l'identification d'une lignée porteuse d'une insertion dans le gène *OST1* (Mustilli et al., 2002). Les plantes KO (*ost1-1*) ne ferment plus leurs stomates en présence d'ABA, et ne limitent plus l'ouverture stomatique lors d'un stress hydrique, tout en gardant une régulation normale de leurs mouvements stomatiques en réponse à la lumière et au CO<sub>2</sub>.

En dépit des nombreux éléments qui restent à préciser sur ces voies de transduction du signal ABA, on sait qu'elles débouchent sur une inhibition des pompes à proton plasmalemiques et une ouverture des canaux anioniques. La dépolarisation membranaire qui en résulte permet l'activation des canaux potassiques sortants et, *in fine*, la fermeture stomatique.

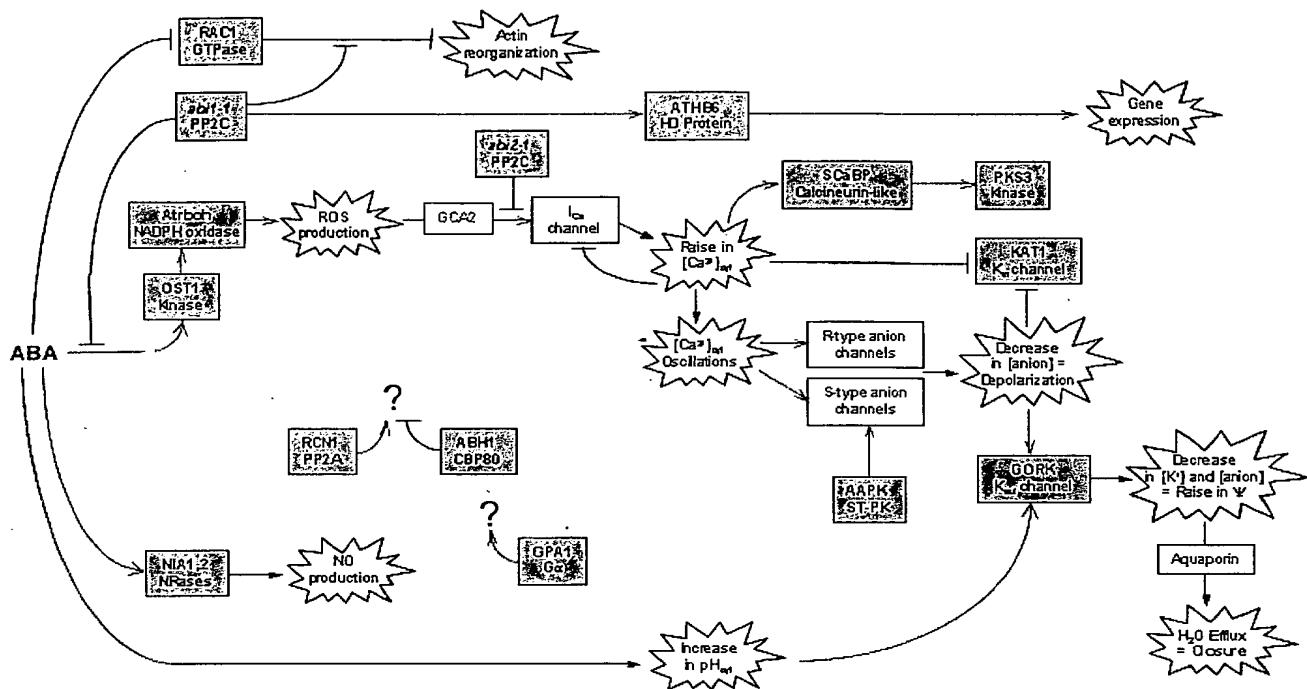


Figure I.9. Voie de régulation de la fermeture stomatique en réponse à l'ABA.

## I.4.- Un modèle d'organe puits : la baie de raisin

### I.4.1.- Contexte agronomique et biologique de l'étude

En vignoble à vin, le suivi du développement des baies, dans le but de prévoir la qualité du millésime et les opérations œnologiques, repose sur la mesure périodique de la teneur en sucres, mais aussi de l'acidité de titration, du pH et de la teneur en K<sup>+</sup> de la pulpe. Ces 3 derniers paramètres sont liés. En effet, en tant que cation endocellulaire le plus abondant, l'ion K<sup>+</sup> est impliqué dans la neutralisation électrique des acides organiques, et participe de ce fait au contrôle du pH et de l'équilibre acido-basique de la pulpe. De nombreuses études montrent qu'une alimentation potassique trop riche se traduit par un déséquilibre de l'acidité du moût (Hale, 1977; Storey, 1987; Delas et al., 1989).

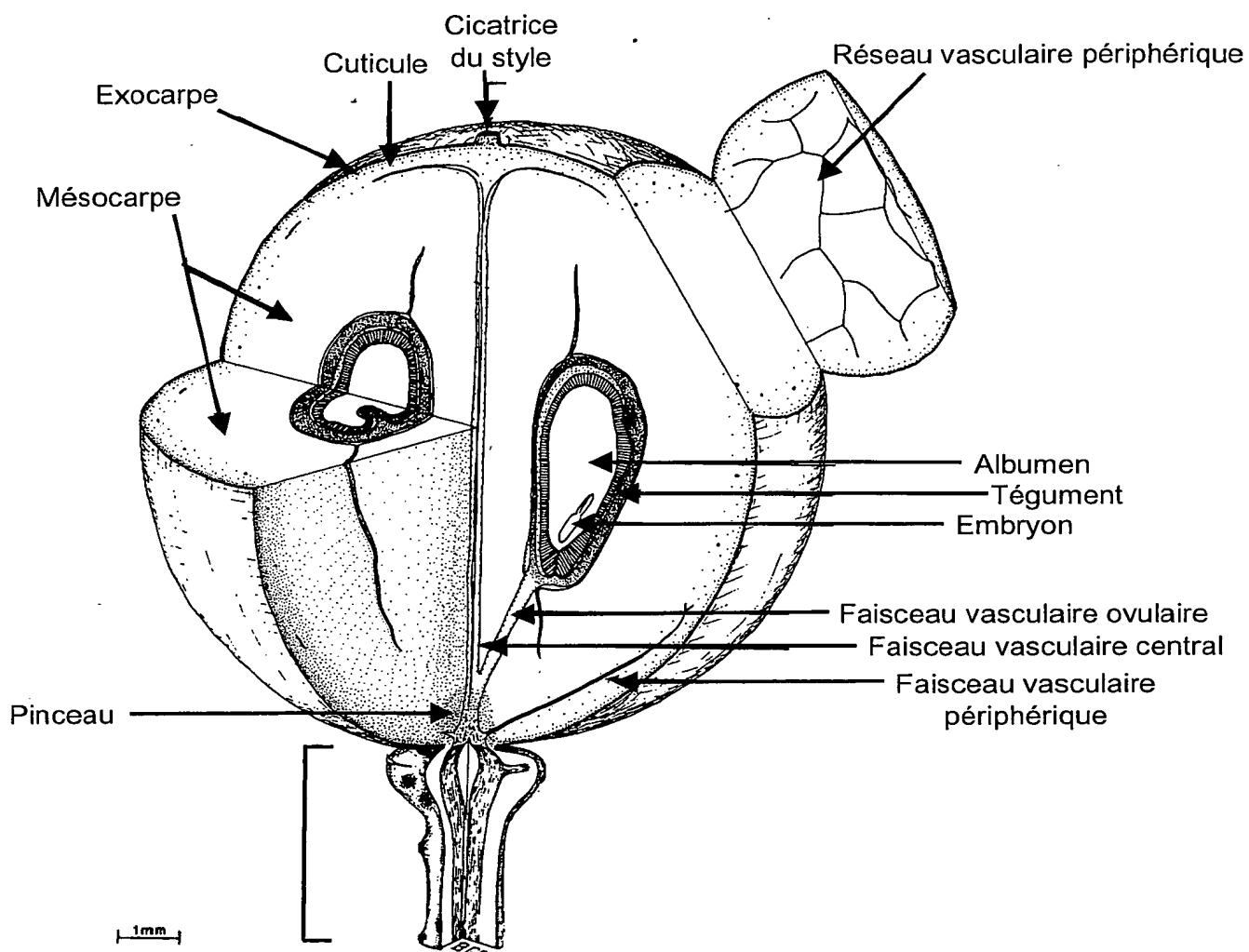
## ***La vigne***

La vigne est une liane appartenant à la famille des Vitacées et à l'ordre des Rhamnales. Le genre *Vitis* est subdivisé en trois groupes : euro-asiatique, asiatique et américain. Le groupe euro-asiatique ne comporte en fait qu'une seule espèce identifiée : *Vitis vinifera* L., qui comprend des milliers de variétés (ou cultivars ou cépages) relativement difficiles à classer. La plupart des variétés cultivées pour la production de raisin de table ou de cuve appartiennent à l'espèce *vinifera*. Les groupes asiatique et américain sont composés d'un plus grand nombre d'espèces. Depuis la crise phylloxérique en Europe, les porte-greffes utilisés en viticulture sont issus de croisements interspécifiques à l'intérieur de groupe américain, ou entre *vinifera* et ces espèces américaines.

## ***La baie de raisin***

La baie de raisin est constituée de deux ovaires, renfermant chacun deux ovules. La fécondation intervient quelques jours après l'anthèse (pollinisation majoritairement autogame). Les quatre ovules de la fleur sont rarement tous fécondés: on ne trouve en moyenne que deux pépins par baie. Généralement, une partie des fleurs d'une inflorescence ne donne pas de baies. Une dizaine de jours après la floraison, le pédicelle d'un certain nombre d'organes se détache de la rafle au niveau d'une zone d'abscission (Bessis and Fournioux, 1992). La raison de cette abscission (absence de fécondation, avortement), n'est pas claire. Lorsque les fleurs sont fécondées, les ovaires et les ovules évoluent respectivement en baies et pépins, tandis que les rafles s'épaissent et se transforment en bois. A maturité, les rafles ne représentent que 10 % environ du poids total frais de la grappe.

Les baies sont des fruits charnus. Ce type de fruits est caractérisé par une importante accumulation d'eau et de sucres au cours de leur développement. La vascularisation de la baie dérive de celle de l'ovaire (Pratt, 1971). Elle est constituée d'une part d'un réseau de petits faisceaux périphériques, situés à quelques millimètres sous l'épiderme, et d'autre part, d'un large faisceau vasculaire central alimentant les pépins. Ces faisceaux se rejoignent au sommet de la baie en un "pinceau" qui s'ancre au niveau du bourrelet du pédicelle, ce dernier constituant la dernière ramifications de la rafle (Fig. I.10).



**Figure I.10. Représentation de la morphologie d'une baie de raisin (d'après Coombe, 1987)**

#### **I.4.2.- Développement de la baie de raisin (Fig. I.11)**

Après la fécondation des fleurs, on distingue trois stades dans le développement des baies : le stade herbacé, la véraison et la maturation. Chacun de ces stades correspond à une véritable reprogrammation de l'expression des gènes ainsi qu'un changement important de la composition cellulaire.

## **Le stade herbacé**

Après la fécondation, les jeunes baies grossissent jusqu'à atteindre environ 2.5 mm de diamètre. Cette augmentation de taille est initialement le fait de divisions mitotiques rapides (Coombe, 1976) dont le pic se situe environ une semaine après l'anthèse (Jona and Botta, 1988). Une période de gonflement cellulaire se déroule ensuite pendant laquelle, la baie augmente son volume d'un facteur 300 environ (Coombe, 1976). Ce grossissement est principalement lié à une forte accumulation d'eau et d'acides organiques, notamment d'acide malique, dans la vacuole des cellules du péricarpe, les concentrations en sucre restant très faibles. Le pH du jus, représentatif de celui de la vacuole, est voisin de 2,5 (Hrazdina et al., 1994), et ne varie pas pendant cette phase du développement.

Les jeunes baies sont chlorophylliennes et légèrement photosynthétiques. Elles possèdent d'ailleurs des stomates fonctionnels quoique relativement peu nombreux, qui dégénèrent après la véraison. La fin de ce stade dit "herbacé" se traduit par un fort ralentissement de la croissance, qui est appelé "plateau herbacé".

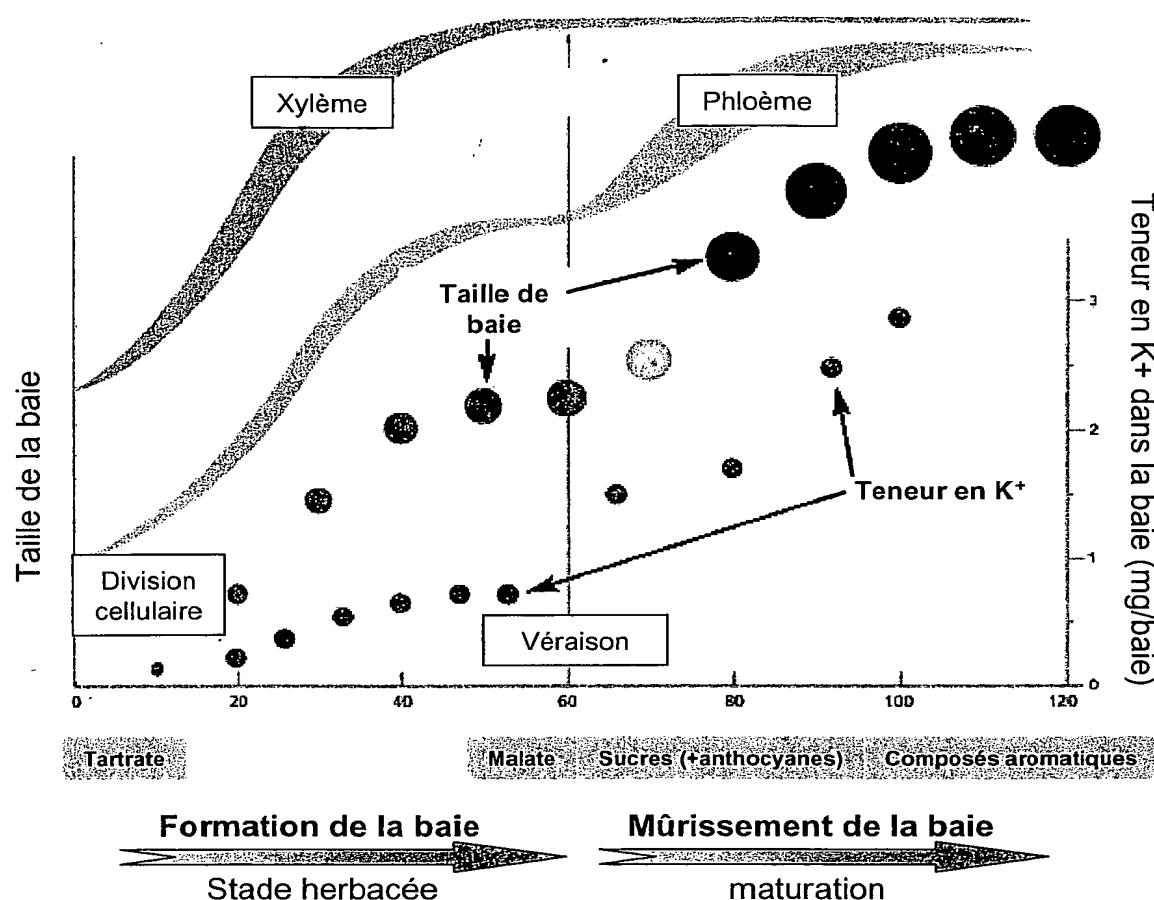
## **La véraison**

La véraison marque la transition entre le plateau herbacé et le mûrissement. Elle se traduit par un ramollissement très rapide des baies, en 24 h environ. Cependant, l'état des baies étant hétérogène à l'intérieur d'une même grappe, la véraison de toutes les baies d'une parcelle peut s'étendre sur plusieurs semaines. La baie, verte et dure, devient translucide, puis, chez les cultivars colorés, prend une teinte violacée à cause de l'accumulation de tanins et d'anthocyanes dans les couches cellulaires de l'épiderme. De profondes modifications biochimiques s'amorcent, et l'accroissement du volume cellulaire reprend.

## **Le mûrissement**

Dès le début de la phase de maturation, les baies accumulent des hexoses (glucose et fructose) importés via le phloème. Ces sucres constituent l'osmoticum principal responsable du gonflement du fruit (Champagnol, 1984). Leur concentration peut atteindre 1 M à maturité (Coombe, 1987). De plus, une partie des acides organiques, principalement l'acide malique, se détruit, entraînant une réduction de l'acidité du fruit (le pH remonte jusqu'à 3.5-4).

La maturité physiologique correspond au moment où les baies ont atteint leur plus grand diamètre et leur taux de sucre maximal. Entre la véraison et la fin de la maturation, la baie double de volume, en moyenne (le rapport masse à véraison/masse à maturité dépend du cépage). Lorsque les baies sont laissées sur pied plus longtemps, elles entrent dans une période de "surmaturation", et vivent sur leurs réserves. Elles perdent de l'eau et commencent à se flétrir, leur jus se concentre (vendanges tardives).



**Figure I.11. Les différentes phases du développement de la baie de raisin. (D'après Mpelasoka B., 2003)**

### **I.4.3.- Aspects physiologiques et biochimiques de la maturation des baies**

Au cours de son développement, la baie passe par des phases de changements drastiques de sa physiologie et de sa composition biochimique. Les parois cellulaires se ramollissent, la pulpe s'enrichit en composés aromatiques et en glucides, tandis que son acidité se réduit. Les principaux aspects de cette maturation sont détaillés ci-dessous.

#### **Ramollissement des baies : modifications pariétales**

Les cellules de la pulpe subissent des modifications structurales importantes pendant la véraison (Harris et al., 1968). Le ramollissement est essentiellement lié à l'apparition d'une activité enzymatique de dégradation des parois cellulaires (Donèche and Chardonnet, 1992), ainsi qu'à une diminution de la concentration en substances pectiques (Silacci and Morrison, 1990). Cela aboutit à une désorganisation de la structure des parois cellulaires (Donèche and Chardonnet, 1992) et a pour conséquence un assouplissement des tissus.

#### **Modifications du système vasculaire xylémien et de l'apport des solutés vers la baie**

L'utilisation de colorants apoplastiques (Creasy et al., 1993) et des mesures de flux hydriques (Ollat, 1997) ont révélé une disruption des vaisseaux du xylème au niveau du pinceau pendant la véraison. Ces discontinuités ont été imputées initialement à l'étirement des vaisseaux provoqué par la croissance rapide des baies au moment de la véraison (Düring et al., 1987; Findlay et al., 1987). Cependant, Creasy et ses collaborateurs ont montré que ces ruptures de vaisseaux chez le Pinot noir et le Merlot ont lieu lorsque la baie se ramollit, c'est à dire quelques jours avant la croissance rapide. La rupture du xylème observé pour certains cépages pourrait donc résulter d'un phénomène encore inconnu, autre que l'étirement des vaisseaux dû à la croissance de la baie.

La conséquence des ruptures xylémiques est, une modification de la voie d'approvisionnement des baies en solutés et en eau. Ces flux sont alors pris en charge par les vaisseaux du phloème. Cependant, la sève phloémienne, riche en divers composés du métabolisme secondaire, comporte moins d'acides organiques, mais plus de sucres, que la sève xylémienne (Coombe, 1992). Ce changement d'approvisionnement expliquerait en partie l'évolution de la composition des baies en acides organiques, sucres et eau après la véraison.

### **I.4.4.- Flux d'acides organiques**

#### **Acidité de la baie**

Le raisin avec un pH de 2,5 pendant le stade herbacée et de 3,5 à maturité, est un fruit extrêmement acide. Les acides organiques accumulés dans les cellules de la baie sont essentiellement synthétisés au niveau des feuilles. Environ 90% de l'acidité de la baie est dû aux acides malique et tartrique, dont les concentrations restent aux environs de 30 à 50 mmol.L<sup>-1</sup> en fin de maturation (Winkler et al., 1974). D'autres acides sont détectés dans les baies, mais à des concentrations bien inférieures : acide citrique (jusqu'à 10 mmol.L<sup>-1</sup> chez certains cultivars), acides succinique et fumarique (moins de 1 mmol.L<sup>-1</sup>). Les taux d'acide tartrique dans la baie sont remarquables, car cette molécule est fort peu représentée dans le règne végétal.

L'acide malique et l'acide tartrique, qui sont les deux acides organiques principaux, sont essentiellement présents sous forme libre, le reste étant sous forme de sels combinés au potassium, au calcium, au sodium et au magnésium. Le potassium, cation majoritaire dans les cellules, est le principal contre-ion de ces acides.

Les acides malique et tartrique ont des profils d'accumulation très différents, malgré leur structure chimique proche. L'acide malique est l'objet d'un métabolisme très actif dans la majorité des organes, et il est mobile. Au contraire, l'acide tartrique, synthétisé dans les organes jeunes (ou il y a beaucoup de divisions cellulaires), s'accumule dans les tissus où il est produit; il est peu mobile et peu métabolisé. Parmi les facteurs influençant le rapport acide tartrique/acide malique qui est un facteur déterminant pour la qualité des vins, la nature du cépage a un rôle important. Certains cultivars (Chasselas, Sémillon) accumulent relativement plus de tartrate que d'autres (Ruffner, 1982). D'autre part, les conditions du milieu et de mode de culture peuvent également altérer ce rapport. En particulier, une fertilisation potassique importante provoque un enrichissement des baies en malate (Hale, 1977; Morris et al., 1983), aux dépends du tartrate (Delas et al., 1989). Et comme ce dernier est l'acide le plus fort du raisin, sa concentration a une grande influence sur le pH du vin. Une acidité trop faible rendant le vin insipide est donc souvent associée à une alimentation potassique excessive.

### **Flux de sucres**

De nombreux glucides s'accumulent dans les baies. Les plus importants sont les hexoses, sucres fermentescibles qui donneront de l'éthanol sous l'action des levures. Les vins non chaptalisés titrant environ 12 % d'alcool (v/v) proviennent de la fermentation de moûts dont la concentration en sucres est d'environ 200 g.L<sup>-1</sup>, soit 1,1 M dans les baies.

Dans une baie mûre, le glucose et le fructose sont présents en quantités équivalentes (80 à 120 g.L<sup>-1</sup> de moût) et représentent 99 % des sucres solubles (Winkler et al., 1974). Le saccharose n'est présent qu'en faible proportion (quelques g.L<sup>-1</sup>). Enfin, des sucres non fermentescibles sont présents à l'état de traces : galactose, ribose, xylose, ainsi que des pentoses (arabinose, rhamnose).

Le raisin accumule peu d'amidon dans les stades verts, à l'inverse des fruits climactériques. La baie est donc tributaire pour sa maturation des importations de sucres en provenance du bois et des feuilles.

Lorsque les baies sont au stade vert, très peu de sucres sont stockés, la quantité de fructose étant environ deux fois inférieure à celle du glucose. L'essentiel des sucres importés par la baie avant la véraison est dégradé par les enzymes de la glycolyse, puis transformé en acides organiques ou respiré.

A la véraison a lieu un brusque apport de sucres. Le taux de sucres des baies vérées est multiplié par 6 à 7 pendant la première semaine suivant la véraison (Ollat, 1997). L'origine de cette accumulation soudaine reste peu expliquée, d'autant plus qu'elle peut se déclencher de façon très hétérogène au sein d'une même grappe. Ce stockage n'est pas attribuable aux capacités photosynthétiques du fruit, qui disparaissent à partir de la véraison. En revanche, la baie acquiert une forte capacité de puits, capable d'induire l'augmentation de l'activité photosynthétique des feuilles (Candolfi-Vasconcelos and Koblet, 1990; Candolfi-Vasconcelos et al., 1994). Les sucres sont véhiculés depuis les organes sources (feuilles et ressources amyloacées des tiges) par le phloème jusqu'à la baie. Le saccharose est le sucre majoritaire dans la sève phloémienne. Son hydrolyse très rapide dans la baie peut être considérée comme un moteur de l'accumulation des hexoses, car elle permet le maintien d'un gradient de concentration du saccharose entre les vaisseaux du phloème et la baie, favorisant la décharge du saccharose dans la baie. Des transporteurs d'hexoses et de saccharose ont été clonés récemment chez la vigne (Fillion, 1997), et leur expression est nettement augmentée à la véraison. Le brusque apport de sucres vers les baies après la véraison représente un réallocation des assimilats antérieurement destinés aux racines (Stoev and Ivantchev, 1977).

Pendant la phase de maturation, la concentration des hexoses augmente de façon linéaire, indépendamment du taux de croissance, ce qui se traduit par un enrichissement

d'environ 10 g de glucides par jour et par grappe. Ainsi, la teneur en glucides passe de 1 % à environ 20 % pendant cette phase. La concentration en fructose est sensiblement équivalente à celle du glucose en fin de maturation.

#### ***I.4.5.- Le potassium dans les baies***

La nutrition minérale de la plante influe sur la qualité du vin. L'effet précis de chacun des ions nutritifs est difficile à apprécier, à l'exception de celui du potassium, qui intervient dans l'équilibre acido-basique du moût. La répartition de cet ion dans la baie et ses effets ont donc été plus particulièrement étudiés.

#### ***Répartition du potassium dans les baies***

Le potassium est le cation majoritaire des baies, devant le calcium, le magnésium et le sodium. Sa répartition varie dans les différents tissus de la baie et au cours du développement. Le potassium est toujours plus concentré (environ 4 fois plus) dans le péricarpe que dans la pulpe (Possner and Kliewer, 1985; Storey, 1987). Sa teneur augmente tout au long du développement et de la maturation de la baie (Possner and Kliewer, 1985). La concentration de K<sup>+</sup> dans le péricarpe des baies matures est proche de 300 mM (Storey, 1987). Des analyses plus détaillées, en microscopie aux rayons X, ont montré que la répartition de K<sup>+</sup> dans le péricarpe semble se faire selon un gradient diminuant des couches externes vers les couches internes. La transition d'avec les assises cellulaires de la pulpe est marquée par une nette discontinuité de la concentration de K<sup>+</sup>. L'accumulation de cet ion dans le péricarpe résulte probablement du fait que cette région est très proche du système vasculaire périphérique, qui représente une large surface de décharge des solutés transportés par le phloème. La concentration en potassium dans les moûts est comprise entre 40 et 50 mM.

#### ***Origine du potassium des baies***

L'origine du potassium de la baie est encore mal connue. Les grappes peuvent contenir près de 50 % du potassium de la plante à maturité. Certains auteurs (pour revue voir Champagnol, 1984) ont observé que les ions K<sup>+</sup> présents dans les baies semblent provenir des feuilles et des tiges par remobilisation et redistribution. Si le système vasculaire emprunté par le potassium pour arriver jusqu'aux baies reste indéterminé avant la véraison, le phloème est en revanche le chemin quasi-exclusif du potassium après la véraison, puisque le xylème présente alors des discontinuités entre les baies et le reste de la plante.

#### ***Interactions du potassium avec les composants de la baie***

Le potassium de la baie est impliqué dans de nombreuses fonctions, dont celles qui ont été décrites auparavant au niveau de la plante entière. Il constitue l'osmoticum inorganique prépondérant dans les cellules de la baie, en particulier celles du péricarpe (Storey, 1987). Aussi, ses interactions avec les acides organiques de la baie ont été particulièrement étudiées. Il a ainsi été mis en évidence une corrélation entre les quantités de potassium et de malate après la véraison et le début de la phase de maturation (Hale, 1977), mais pas entre le potassium et le tartrate, quel que soit le stade de maturation. Au stade vert, l'apport de K<sup>+</sup> intervient dans le grandissement cellulaire, du fait de son rôle d'osmoticum, et ce cation agit également en tant que contre-ion des acides tartrique et malique qui s'accumulent alors essentiellement dans la pulpe et un peu dans le péricarpe (Possner and Kliewer, 1985; Coombe, 1987; Iland and Coombe, 1988). Puis, après la véraison, la perméabilité du tonoplaste à l'acide malique augmente (Gutierrez-Granda and Morrison, 1992), et la fraction d'acide malique restée sous forme libre dans la vacuole

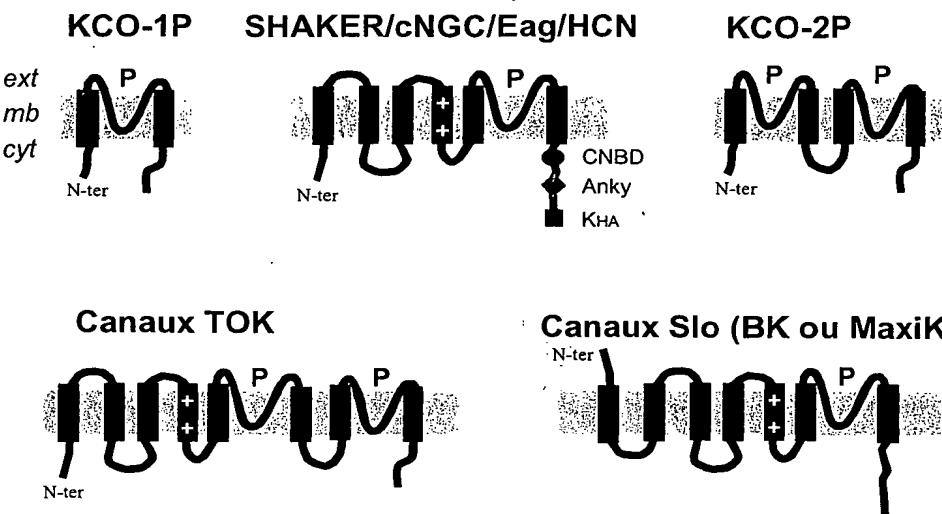
passe dans le cytoplasme et y est respirée. Dans ces conditions, plus les quantités de K<sup>+</sup> sont importantes dans les baies (suite à une fertilisation potassique importante par exemple), plus la fraction de sels potassiques de malate est importante par rapport à la fraction d'acide malique libre, ce qui à conduit certains auteurs (*i.e.* (Hale, 1977) à penser que les quantités de malate augmentent quand la teneur en K<sup>+</sup> augmente. En réalité, l'acide malique sous forme de sels reste dans la vacuole et n'est pas respiré. La conséquence de cette accumulation de malate de potassium est une augmentation du pH du moût (Hale, 1977; Champagnol, 1984; Gutierrez-Granda and Morrison, 1992), mais sans changement de l'acidité titrable (puisque ce paramètre est basé sur l'échange de protons).

Le tartrate est essentiellement sous forme de sels de K<sup>+</sup> (KHTartate) et Ca<sup>2+</sup>, qui sont très peu solubles. Pour Storey (1987), les sels de Ca<sup>2+</sup> sont majoritaires, bien que le K<sup>+</sup> soit largement plus représenté que Ca<sup>2+</sup>, car le premier ion reste sous forme soluble dans la vacuole tandis que le second s'accumule sous forme de précipités.

### I.5.- Les canaux de type Shaker

Avec le développement des techniques de biologie moléculaire, des études en système hétérologue, et le séquençage des génomes, de nombreux transporteurs responsables des conductances observées jusqu'alors avec les techniques d'électrophysiologie ont pu être identifiés au niveau moléculaire et caractérisés individuellement. En ce qui concerne les canaux potassiques, cinq familles (ou groupes de familles) de gènes codant des sous-unités fonctionnelles (dites sous unités  $\alpha$ , en opposition aux sous unités régulatrices dites  $\beta$ ) ont été identifiées chez les eucaryotes (Fig. I.12).

Les canaux Kir possèdent 2 Segments TransMembranaires et 1 domaine Pore (2 STM/1 P), ce qui représente le schéma structural le plus simple. Ils permettent l'entrée de potassium (pour revue, Reimann and Ashcroft, 1999). Un deuxième schéma structural à base de six segments transmembranaires et d'un domaine pore (6STM/1P) concerne de nombreux gènes codant des canaux ayant des caractéristiques de sélectivité et des modes de régulation de leur ouverture très différentes : ces canaux du deuxième groupe se répartissent dans quatre familles, les cNGCs (cyclic Nucleotide Nating Nannels), les Eag (Ether-a-gogo), les HCN (Hyperpolarization and Cyclic nucleotide-gated channel) et les canaux Shaker. Le troisième groupe structural rassemble des canaux formés de 2 motifs de type Kir en tandem : la famille des canaux TWIK à 4 STM/2 P, qui ont une faible rectification (Lesage and Lazdunski, 2000). Le quatrième groupe correspond à des canaux structurés comme un Kir et un Shaker en tandem : les canaux de la famille TOK, dont les sous unités sont constituées de 8 STM/2 P (Ketchum et al., 1995). Enfin, un cinquième genre structural a été identifié : la famille des canaux Slo (ou BK ou MaxiK), dont les sous unités  $\alpha$  comportent 7 segments transmembranaires et un domaine pore (7 STM/1 P). La sous-unité Slo se présente comme une sous-unité Shaker qui possèderait un segment transmembranaire supplémentaire en N-ter du premier segment, faisant que l'extréminé N-terminale du polypeptide est extracellulaire. Les canaux de cette dernière famille sont régulés par le potentiel de membrane et par le calcium (Toro et al., 1998; Vergara et al., 1998).



**Figure I.12 Structure secondaire des 5 différents canaux potassiques clonés**

Le canal Shaker de la Drosophile (*Drosophila melanogaster*) est le premier canal potassique à avoir été cloné. Il a été identifié parce que des drosophiles portant une mutation dans ce gène, tremblaient (to shake en anglais) des pattes quand elles étaient anesthésiées à l'éther. Des expériences de voltage clamp sur des muscles de larves de ces mouches ont montré que la mutation affectait un courant transitoire potassique. Une fois le gène codant le canal Shaker cloné par marche chromosomique (Papazian et al., 1987), les autres canaux de la famille ont été identifiés et isolés grâce à différentes techniques de biologie moléculaire. Aujourd'hui, des canaux Shaker ont été trouvés chez de nombreuses espèces appartenant à tous les règnes du vivant, bactéries, végétaux, animaux, signifiant sûrement que toutes les espèces possèdent des canaux de type Shaker.

Cependant, en fonction des espèces, les sous unités α composant les canaux n'ont pas la même structure, ces différences étant essentiellement localisées dans les parties N et C-terminales.

#### **Structure générale des canaux shaker végétaux**

Le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* a révélé la présence de 9 gènes codant des sous-unités α de canaux Shaker. L'alignement des séquences de ces gènes, les classe en 5 sous-familles, la sous-famille de AKT1 (AKT1, SPIK et AKT6), celle de KAT1 (KAT1 et KAT2), celle de SKOR (SKOR et GORK), et deux sous-familles monogéniques (chez *Arabidopsis thaliana*) celle AKT2 et celle de AtKC1. Des membres de ces sous-familles ont été clonés chez d'autres espèces. Les canaux Shaker fonctionnels sont composés de quatre sous-unités (identiques: homotétrramères, ou différentes: hétérotétrramères). Les six segments transmembranaires de chaque sous unité sont notés de S1 à S6, la région P, contribuant à former le pore du canal, est située entre les

segments S5 et S6 (Fig. I.13 A). Les extrémités amino- et carboxy-terminale sont toutes les deux cytoplasmiques (Uozumi et al., 1998). Chez les Shaker de plantes, la région cytoplasmique N-terminale est assez courte, par contre la région C-terminale cytoplasmique a une masse avoisinant la moitié de celle de la sous-unité. Elle comprend, parmi différents domaines remarquables, une région de près de 80 a.a. formant un site potentiel de fixation des nucléotides cycliques. En aval de ce site, les canaux Shaker végétaux (sauf ceux de la sous-famille KAT1) possèdent un domaine dit "ankyrine" car il est composé de la répétition d'un motif de 33 a.a. identifié dans la protéine ankyrine présente dans les érythrocytes. Enfin, les 50 derniers acides aminés en C-ter forment un domaine conservé chez les canaux végétaux appelé  $K_{HA}$  (riche en résidus hydrophobes et acides ; Ehrhardt et al., 1997). Le domaine de fixation des nucléotides cycliques, et le domaine  $K_{HA}$  semblent impliqués dans l'hétérotétramérisation des canaux (Daram et al., 1997), le domaine  $K_{HA}$  est aussi supposé permettre un regroupement entre les canaux au sein de "clusters" (Fig. I.13 B).

### ***Le domaine pore***

En 1990 MacKinnon et Yellen ont suggéré que la partie transmembranaire présente entre les segments S5 et S6 soit impliquée dans la formation du pore (MacKinnon and Yellen, 1990). Cette implication a été confirmée l'année suivante et ce domaine a donc été nommé "P" (Hartmann et al., 1991; Yellen et al., 1991; Yool and Schwarz, 1991). Les domaines P des quatre sous-unités forment la partie externe du pore. La partie interne du pore est délimitée par une partie des boucles intracellulaires S4-S5, ainsi par la région C-terminale des quatre S6 (Isacoff et al., 1991; Lopez et al., 1991; Lopez et al., 1994).

D'après des études cristallographiques réalisées initialement sur le canal bactérien KCSa, le pore des canaux sélectifs de  $K^+$  possède une région intracellulaire relativement large et une région extracellulaire étroite, constituant le filtre de sélectivité. La pénétration de  $K^+$  dans la région étroite requiert qu'il ait perdu sa coque d'hydratation. Son cheminement dans cette région étroite, où le potassium occupe successivement 3 sites, s'explique par le fait que  $K^+$  est parfaitement

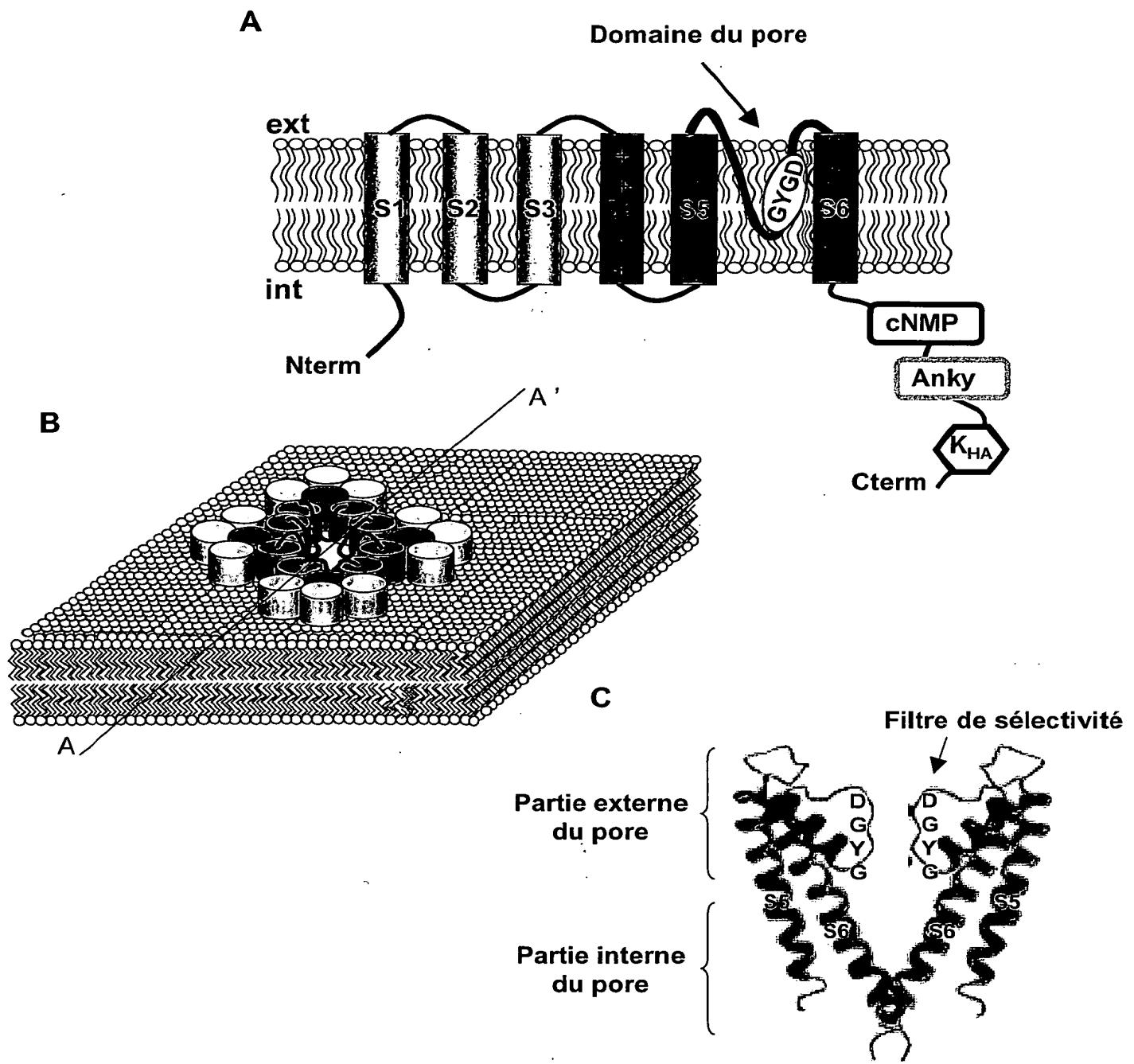


Figure I.13. Structure des canaux Shaker végétaux.

(A) Structure secondaire d'une sous unité de canaux Shaker. Une sous unité de canal Shaker est constitué de 6 segments transmembranaires notés de S1 à S6. Quatre sous unité sont indispensables à la formation d'un canal (B), représenté ici dans la membrane. (C) Représentation du pore du canal vu selon la coupe AA' (indiquée en B), seul les segments S5 et S6 sont montrés

coordonné par des groupements carbonyle (appartenant à des résidus des domaines P) qui "miment" une coque d'hydratation (Roux and MacKinnon, 1999). La sélectivité des ions se fait en dehors et dans cette partie du pore : le sodium, petit, ne peut être complètement déshydraté et ne peut pas pénétrer dans la région étroite du pore, le césium (un inhibiteur spécifique des canaux sélectifs du potassium) y pénètre pour s'y bloquer (Doyle et al., 1998; Roux and MacKinnon, 1999; Fig. I.13 C).

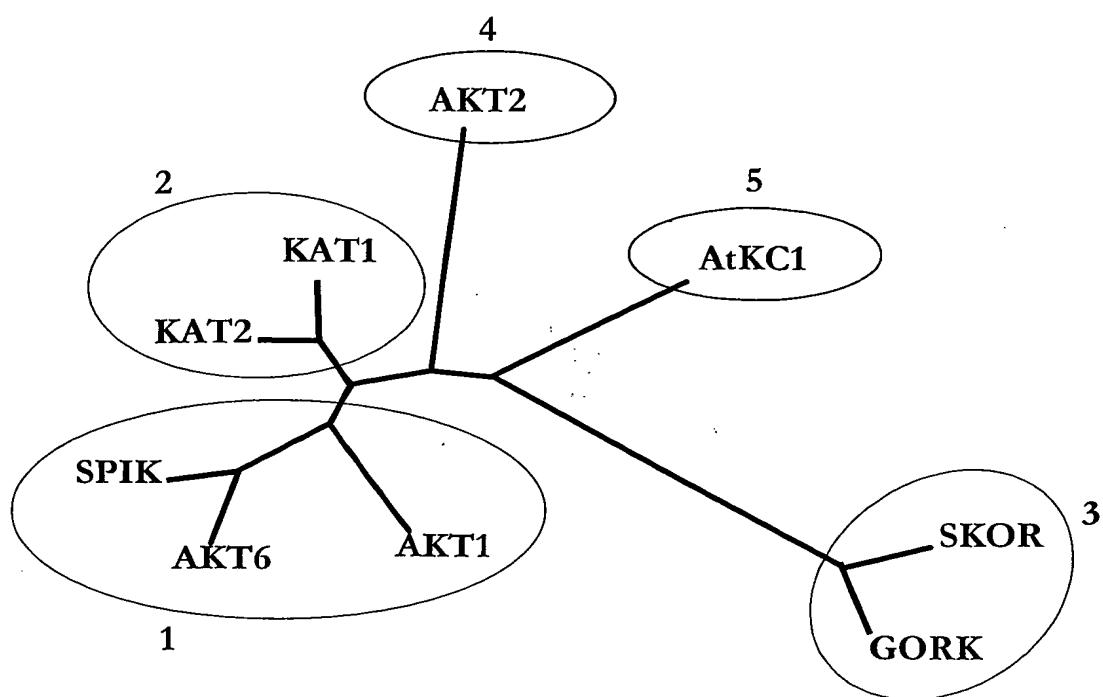
### **Le senseur de voltage**

Les canaux Shaker sont des canaux "voltages dépendants", c'est à dire que l'ouverture du pore est favorisée par la conformation adoptée pour certaines valeurs du potentiel de membrane. Le mécanisme moléculaire responsable de ce contrôle de l'activité du canal par le voltage a très tôt été attribué aux acides aminés chargés positivement présents dans le S4 (Armstrong and Bezanilla, 1973). L'intervention d'autres domaines du canal (tel que des résidus chargés négativement dans les segments S2 et S3, qui interagissent avec S4) a été démontrée plus récemment (Papazian et al., 1995; Papazian and Bezanilla, 1997). Sous l'effet d'une variation du champ électrique dans la membrane, le segment S4 de chacune des quatre sous-unités se déplace (vers l'intérieur de la cellule en cas d'hyperpolarisation et dans la direction opposée en cas de dépolarisation cellulaire). Différents modèles, très débattus ces dernières années, ont été proposés pour ces mouvements (translation simple ou accompagnée d'une rotation sur son axe, pivotement) mais il est admis que le mouvement des segments S4 provoque le changement conformationnel qui préside à l'ouverture du pore.

#### **I.5.1.- Rôle des canaux Shaker chez *Arabidopsis thaliana***

En 1992, le criblage de banques d'ADNc d'*Arabidopsis* par complémentation fonctionnelle d'une souche de levure déficiente dans l'absorption de potassium a permis d'isoler deux gènes codant des sous unités  $\alpha$  de canaux shaker, *AKT1* (Sentenac et al., 1992) et *KAT1* (Anderson et al., 1992). Des criblages de banques d'ADNc avec des sondes correspondant à des fragments des ADNc des gènes *AKT1* et *KAT1*, ont permis l'isolation des ADNc *AKT2* (Cao et al., 1995), *AKT3* (Ketchum and Slayman, 1996), *KAT2* (Butt et al., 1997), et *AtKC1* (Reintanz et al., 2002). Il faut noter que *AKT3* s'est avéré n'être qu'une forme incomplète en 5' de *AKT2*. Des recherches dans les banques d'EST ont permis d'isoler puis de cloner un sixième gène, *SKOR* (Gaymard et al., 1998). Et enfin, le séquençage du génome d'*Arabidopsis* a révélé la présence des trois derniers des neuf gènes Shaker d'*Arabidopsis*, *GORK* (Ache et al., 2000), *SPIK* (Mouline et al., 2002) et *AKT6* (Lacombe et al., 2000).

L'étude de l'activité de ces canaux à l'aide de techniques électrophysiologiques, indique des différences de propriétés fonctionnelles qui recoupent les groupes établis sur la base de la séquence polypeptidique (Cf. § I21, Fig. I.14). *AKT1*, *SPIK*, et *AKT6* forment des canaux entrants. *KAT1* et *KAT2* forment également des canaux entrants (dépourvus de domaines ankyrines), *SKOR* et *GORK*, à l'autre extrémité de l'arbre, des canaux sortants. Situé en position intermédiaire, *AKT2* forme des canaux à faible rectification (à la fois entrants et sortants) et *AtKC1* est une sous-unité "silencieuse". Des membres de chacune de ces familles ont été retrouvés chez d'autres espèces végétales comme la vigne, la pomme de terre, la carotte, le peuplier, le maïs, etc (Pilot et al., 2003).



**Figure I.14. Relations phylogénétiques entre les différents canaux Shaker chez *Arabidopsis thaliana*.**

L'arbre est réalisé à partir des séquences entières des protéines, à l'aide du logiciel Darwin (Gonnet *et al.*, 1992). La longueur des branches est proportionnelle à la distance évolutive séparant chaque nœud.

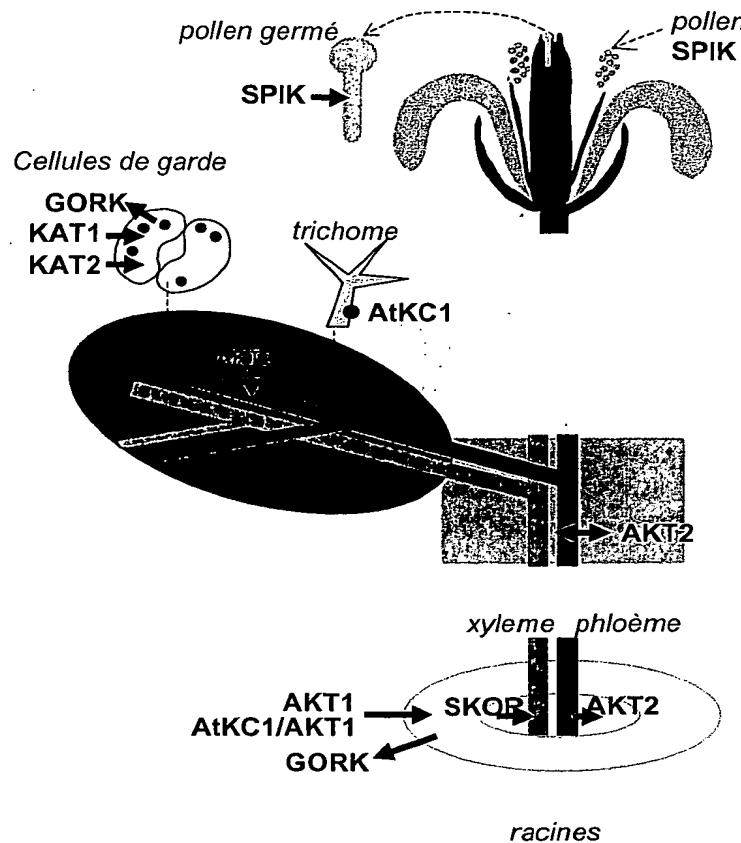
## **Rôle des différents canaux de type Shaker (Fig. I.15)**

### Rôle trophique:

Les canaux Shaker représentent une fraction majeure de la conductance membranaire des cellules où ils sont exprimés. Contrairement aux canaux Shaker animaux, les canaux Shaker des plantes ne montrent pas d'inactivation. Ils sont capables de catalyser des flux soutenus et peuvent avoir un rôle dans la circulation/distribution de K<sup>+</sup> dans la plante (Cf. Fig. I.15). Par exemple, AKT1 a été identifié par Hirsch et ses collaborateurs comme un gène codant le canal potassique entrant décrit dans les tissus périphériques de la racine (Cf. § I.2.2), c'est à dire qu'il est le transporteur à basse affinité permettant l'entrée de K<sup>+</sup> dans la racine (Hirsch et al., 1998). Des travaux plus récents ont précisé que cette fonction racinaire implique également le polypeptide AtKC1, probablement au sein de canaux hétéromériques AKT1/AtKC1 (Reintanz et al., 2002). SKOR, est exprimé dans la stèle racinaire et est probablement impliqué dans la charge du xylème en potassium (Cf § I.2.3; Gaymard et al., 1998). Enfin, AKT2, exprimé dans le phloème de tous les organes et formant des canaux permettant l'influx et/ou l'efflux de K<sup>+</sup>, pourrait être impliqué dans la charge (au niveau des organes sources) et la décharge (au niveau des organes puits) de la sève du phloème (Lacombe et al., 2000; Deeken et al., 2002).

### Rôle dans le contrôle de l'osmolarité des cellules:

De nombreux mécanismes biologiques sont basés sur des variations de l'osmolarité cellulaire, mouvements stomatiques, nasties, croissance des poils absorbants, développement du tube pollinique, etc. Le potassium et les canaux shaker interviennent dans la majorité de ces mécanismes. Les canaux KAT1 et KAT2 sont impliqués dans l'influx de potassium menant à l'ouverture stomatique (Nakamura et al., 1997; Kwak et al., 2001; Pilot et al., 2001; Szyroki et al., 2001). Et le canal SPIK, qui est exprimé dans le grain de pollen, permet l'entrée de potassium dans le tube pollinique, entraînant son allongement (Mouline et al., 2002).



**Figure I.15. Schéma de la localisation de l'expression des différents canaux Shaker chez *Arabidopsis thaliana* (véry et Sentenac, 2003).**

Ces flèches → en face des noms de canaux indiquent la direction du flux catalysé par les canaux (lorsque cette direction est connue)

## I.6.- Contenu du mémoire

Après la présentation du matériel végétal, et des techniques acquises ou mises au point, je présenterai mes travaux sous la forme de quatre chapitres correspondant chacun à un article ou un manuscrit préparé pour publication (en anglais), précédé d'une courte introduction (en français). Le premier article, qui concerne l'implication du canal GORK dans la fermeture stomatique, a été publié dans PNAS. Le deuxième manuscrit décrit la mise au point d'un nouveau système d'expression hétérologue qui devrait permettre d'étudier l'activité de canaux végétaux ne s'exprimant pas dans les systèmes animaux usuels (soumis comme un "technical advance"). Le troisième manuscrit décrit les travaux de caractérisation de AtKC1 dans l'équipe; une partie de ce travail a consisté à étudier l'hétérotéramérisation de la sous-unité AtKC1 avec les sous unité KAT1 et AKT1 dans le système d'expression décrit dans le chapitre précédent. Le quatrième chapitre décrit une opération de recherche concernant le rôle d'un canal Shaker cloné chez *Vitis vinifera* dans le développement de la baie de raisin.

Quelques perspectives ouvertes par mon travail sont présentées après ce quatrième manuscrit. La liste de références bibliographiques en fin de mémoire regroupe les citations de l'ensemble du mémoire à l'exception des 4 articles.

## **II.- MATERIEL ET METHODES**

## **II.1.- Matériel végétal, conditions et milieux de culture**

Les études présentées dans ce mémoire ont été réalisées sur deux espèces végétales, *Arabidopsis thaliana* et *Vitis vinifera*.

*Arabidopsis thaliana* est l'espèce modèle en génétique moléculaire végétale. Les différents génotypes utilisés dans cette étude (mutants d'insertion et transformants) sont tous issus de l'écotype Wassilevskaja (WS). Les graines des mutants d'insertion *gork-1*, *atk-1* ont été obtenues à partir d'un criblage par PCR des 40 000 lignées de mutants d'insertion de la banque de l'INRA de Versailles.

*Vitis vinifera* est une plante d'intérêt agronomique et économique majeur. Les plants de vigne mutants ont été obtenus par Réjane Pratelli (notre équipe) et Laurent Torregrossa (Laboratoire d'arboriculture et d'horticulture, UMR 1098, Montpellier) par régénération de cals de vigne de cépage Portant transformés par *Agrobacterium tumefaciens* portant la construction d'intérêt.

### **II.1.1.- Culture d'*Arabidopsis* sur terreau**

Les plantes utilisées pour les expériences de biologie moléculaire, d'électrophysiologie et les mesures de perte d'eau sur rosettes excisées sont cultivées sur terreau (Humin substrat N2 Neuhaus, Klasmann-deilmann, Allemagne) en alvéoles individuelles de 75 cm<sup>3</sup> dans une chambre de culture "jours courts" (photophase 8h de jour, densité photonique de 250 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, humidité relative de 70 % et température de 20°C).

### **II.1.2.- Culture d'*Arabidopsis* en milieu hydroponique**

Les plantes servant aux mesures de transpiration sont cultivées en hydroponie. Pour cela, des tubes Eppendorfs coupés et grillagés à leur extrémité basale sont remplis de sable puis placés sur un disque plastique percé de 6 trous dont les diamètres correspondent à ceux des Eppendorfs. Les disques sont ensuite posés sur un plateau de polystyrène flottant dans une bassine contenant huit litres de solution nutritive dont la composition est la suivante: KNO<sub>3</sub> 1.25 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1.5 mM, MgSO<sub>4</sub>, 742 µM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 185 µM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 50 µM, ZnSO<sub>4</sub> 0.1 µM, MoO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> 0.25 µM, CuSO<sub>4</sub> 0.7 µM, MnSO<sub>4</sub> 12 µM. Chaque dispositif Eppendorf est ensuite ensemencé d'une graine. Les plantes poussent en chambre de culture (photophase 12 h de jour, densité photonique de 300 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, humidité relative 50 % et température de 20°C). La solution nutritive est renouvelée toutes les semaines (Lejay et al., 1999).

### **II.1.3.- Culture d'*Arabidopsis* en pots individuels**

Les plantes servant pour les expériences de transpiration de plantes entières sur terreau sont cultivées individuellement dans des pots plastiques de 150 mL remplis de 80 g de terreau (Humin substrat N2 Neuhaus, Klasmann-deilmann, Allemagne) dans une chambre de culture "jours courts" (photophase 8 heures, densité photonique de 250 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, humidité 70 %, température constante de 20°C). Chaque pot est fermé par un couvercle qui empêche toute perte directe d'eau du terreau par évaporation. Ce couvercle est percé à l'aide d'un emporte pièce de 1 cm de diamètre permettant le passage du collet de la plante sans toutefois permettre une perte d'eau trop importante par la déshydratation du terreau. Lors de la première expérimentation, les plantules présentaient un phénotype étiolé dû à l'excès de lumière rouge provoqué par la réverbération de l'éclairage sur le couvercle rouge du pot, les couvercles ont donc été recouverts de scotch blanc pour les expériences suivantes. La teneur initiale en eau du terreau est déterminée sur un aliquote de terre que

l'on déhydrate à l'étuve. Chaque pot est ensemencé par une graine et l'irrigation est effectuée à l'aide d'une seringue introduite dans la terre entre le collet de la plante et le bord du trou. La quantité d'eau présente à un temps donné dans chaque pot est estimée par pesée.

#### ***II.1.4.- Culture d'*Arabidopsis* sur vermiculite***

Les plantes utilisées pour les expériences au CEA de Cadarache sont d'abord mises à germer en boîtes de Petri sur milieu MS/2. Quatre jours après la germination, les plantules de tailles identiques sont transférées dans des pots de culture contenant de la vermiculite. Elles sont alors cultivées en conditions contrôlées dans un phytotron (photophase de 8 heures, densité photonique de  $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 70 % d'humidité relative, température constante de 21°C). Les plantes sont arrosées par percolation trois fois par jour avec une solution nutritive de type Hoagland contenant  $\text{MgSO}_4$  1mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,3 mM,  $\text{NaCl}$  0,17 mM,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  1 mM,  $\text{KNO}_3$  2 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,1 mM  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  7,5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnSO}_4$  0,37 mM,  $\text{ZnSO}_4$  0,31 mM,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,93 mM,  $\text{CuSO}_4$  9  $\mu\text{M}$ , mascolate de fer (10%, m/v) (Lasceve et al., 1997).

#### ***II.1.5.- Culture du tabac***

Les tabacs utilisées pour les expériences d'électrophysiologie (Cf. § II.3.2, II.3.3 et II.3.4) sont cultivés *in vitro*. Des entre-nœuds de tabac sont repiqués dans des pots stériles en verre d'un volume de 400 mL contenant 75 mL de milieu MS (Murashige and Skoog, 1962; Sigma M5524) dilué deux fois, saccharose 1 %, Agar 0.8 %, MES-KOH 5 mM pH 5.5). Les feuilles utilisées pour les expériences sont prélevées sur des plants âgés de 3 à 4 semaines ayant poussé en phytotron (photophase de 16 h, température de 20°C).

#### ***II.1.6.- Culture de la vigne***

Les vignes transformées par le plasmide vide (vignes contrôles), celles surexprimant le peptide SOR sont régénérées à partir des cals transformés. Après un passage sur gelose, ces vignes sont mises en terre dans des pots de 15 litres. La terre est mensuellement enrichie par ajout de 200 g d'engrais osmocote (Scotts France Sarl, France) afin de pallier des carences possible en potassium, produits azotés ou phosphatés. Les baies sont récoltées sur des plants de deux et trois ans cultivés respectivement en serre plastique et en serre S2 (température maintenue au minimum à 20°C, photophase de 16 heures).

### **II.2.- Analyse physiologique**

#### ***II.2.1.- Etude des pertes d'eau sur rosettes excisées (*Arabidopsis*)***

Des plantes âgées de quatre à six semaines cultivées en chambre de culture jours courts (§ II.1.1) sont placées dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau quelques heures avant le début de la période d'obscurité. Au moment de l'extinction des lampes, les rosettes sont excisées. La variation de leur masse est suivie par pesées successives toutes les 5 minutes pendant deux heures, permettant ainsi d'observer les cinétiques de déshydratation de chaque rosette.

#### ***II.2.2.- Mesure de l'ouverture stomatique (*Arabidopsis*)***

Ces expériences ont été réalisées dans le Laboratoire des Echanges Membranaires et Signalisation du CEA de Cadarache, en collaboration avec Alain Vavasseur. Les mesures

sont faites sur des épidermes isolés de plantes âgées de 4 à 6 semaines cultivées sur vermiculite (§ II.1.4).

Des feuilles matures sont prélevées avant le début de la période lumineuse, et sont collées par leur face abaxiale sur une lamelle de verre avec de la colle vitale siliconée (Dow Corning 355, Vermed, France). En grattant la feuille collée avec une lamelle, les couches de cellules mésophylliennes sont arrachées alors que l'épiderme inférieur reste fixé. Les lamelles portant les fragments d'épiderme sont rincées abondamment à l'eau puis sont déposées dans une boîte de Petri de 5 cm de diamètre contenant 5 mL de solution tampon : KCl 10 mM, KOH 30 mM, MES-acide iminodiacétique 10 mM pH 6,1 (Lasceve et al., 1997).

Les épidermes sont soumis à différents traitements destinés à faire varier l'ouverture stomatique. Après trois heures de lumière, la fermeture stomatique est provoquée soit par ajout d'ABA (acide abscissique) aux concentrations finales 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , soit par passage à l'obscurité. Après trois heures d'obscurité, l'ouverture est induite par transfert à la lumière. Les mesures visant à obtenir les ouvertures à l'état stationnaire sont réalisées après trois heures de traitement. Pour les cinétiques (d'ouverture ou de fermeture), les mesures sont effectuées toutes les 30 minutes pendant trois heures.

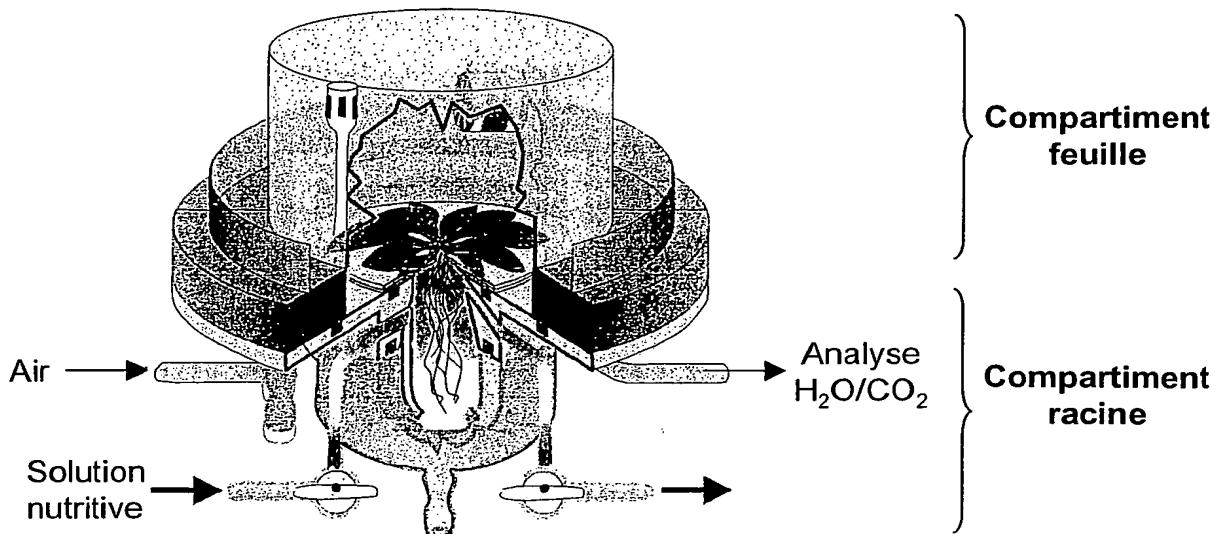
La largeur du pore stomatique est mesurée sous un grossissement  $\times 40$  à l'aide d'un microscope optique couplé à une caméra CCD et à une table à digitaliser reliée à un ordinateur.

### **II.2.3 - Mesures des échanges gazeux et hydriques (*Arabidopsis*)**

Ces expériences sont réalisées au CEA de Cadarache dans le laboratoire d'Alain Vavasseur. Le but est de mesurer en continu la conductance foliaire et les échanges de CO<sub>2</sub> d'une plante dans des conditions contrôlées. La chambre expérimentale (Lasceve et al., 1999) se compose d'un "compartiment feuille" et d'un "compartiment racine" séparés de façon étanche (figure II.1). Les deux compartiments ne communiquent entre eux que par le collet et la tige de la plante. Le "compartiment feuille" est placé dans un circuit gazeux ouvert où sont mesurées des variations rapides et de faibles amplitudes des teneurs en eau et en CO<sub>2</sub> de l'air. Les données sont numérisées et enregistrées grâce à un ordinateur équipé d'une carte d'acquisition (Labview, National Instruments, TX, USA). Le "compartiment racine" est rempli de 100 mL de solution nutritive. Cette solution circulante est continuellement oxygénée et thermostatée. Lors du traitement ABA, l'acide abscissique est ajouté dans la solution nutritive, et celle-ci est renouvelée tous les jours afin de maintenir les concentrations constantes. En condition standard, la température du compartiment aérien est de 21°C la nuit et de 22°C le jour. Le "compartiment racine" est maintenu à 20°C. L'humidité relative est de 70% pour permettre la croissance des plantes sans créer de stress.

La transpiration est rapportée à la consommation de CO<sub>2</sub> car celle-ci est proportionnelle à la surface foliaire.

Afin d'obtenir les paramètres de demi ouverture lors des cinétiques d'ouverture et de fermeture stomatique, les valeurs mesurées sont ajustées par des fonctions mono-exponentielles croissantes pour l'ouverture  $f=x_0+a*(1-e^{-t/\tau})$  et décroissantes pour la fermeture  $f=(x_0-a)+ae^{-t/\tau}$  où  $x_0$  représente la valeur de la transpiration en phase stationnaire avant l'induction de l'ouverture ou de la fermeture,  $a$  est l'amplitude du mouvement stomatique, et  $\tau$  le temps pour que l'ouverture ait atteint 63% de son amplitude maximale.



**Figure II.1: Représentation schématique de la chambre de mesure des échanges gazeux**

#### **II.2.4.- Mesures des cinétiques d'ouverture et de fermeture stomatique (*Arabidopsis*)**

Ces expériences ont été réalisées dans le Laboratoire des Etudes Physiologiques sous Stress Environnementaux (LEPSE, UMR 759) de l'INRA de Montpellier, en collaboration avec Thierry Simonneau. Les plantes sont cultivées sur milieu hydroponique en chambre de culture jours courts (§ II.1.2). Après une période de six à huit semaines, les tubes Eppendorf contenant les plantes sont prélevés et sont insérés dans un trou percé dans le couvercle d'un pot de 150 cm<sup>3</sup> rempli au ¾ de solution nutritive. Le système est rendu étanche en entourant l'Eppendorf par de la gomme arabique. Les pots sont recouverts de papier aluminium pour protéger les racines de la lumière. Les plantes sont ensuite placées dans une chambre de culture où le VPD (demande évaporative), l'intensité lumineuse et la ventilation de l'atmosphère sont contrôlés. Après quarante minutes d'acclimatation aux nouvelles conditions environnementales, leur perte de masse par évapotranspiration est suivie par pesées successives.

#### **II.2.5.- Mesure de la transpiration nocturne et diurne (*Arabidopsis*)**

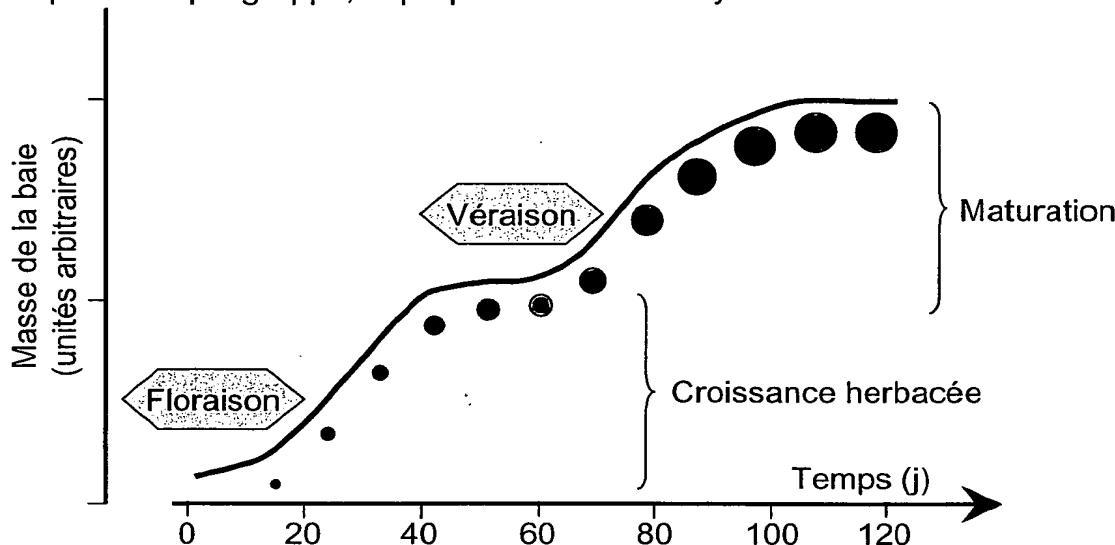
Les plantes cultivées sur terreau en pots individuels (§ II.1.3) sont pesées à 9h00 lors de l'allumage des lampes et à 17h00 lors de leurs extinction. L'évaporation du terreau étant négligeable, les pertes de masse sont liées à la transpiration par les feuilles. Chaque soir, de l'eau est ajoutée aux pots afin que le terreau ait la même teneur en eau pour toutes les plantes.

Lors des analyses, la transpiration est rapportée à la surface foliaire recouvrante, pour cela des photos sont prises tous les deux jours et la surface des feuilles est estimée par comptage de pixels grâce au logiciel Optimas 6.1.

### **II.2.6.- Suivi de la véraison (*Vitis*)**

Le développement de la baie peut être schématisé par deux phases de croissance de type sigmoïdal; le premier plateau marque la fin de la croissance herbacée, et le deuxième plateau indique la maturité de la baie (figure II.2 et § I.4.2). La véraison représente la transition entre le premier plateau et la seconde phase de croissance. C'est un point obligatoire du développement de chaque baie, et chaque baie subit les mêmes changements à ce stade, c'est pour cela que pour niveler l'hétérogénéité entre les grappes et les vignes, nous centrons nos expériences sur la véraison.

Pour suivre la véraison, qui se traduit par un ramollissement rapide et par une pigmentation violacées de la baie (24h environ), nous estimons tous les deux jours, par comptage et pour chaque grappe, la proportion de baies ayant subit ces transformations.



**Figure II.2: Développement de la baie de raisin.**

Schéma représentant l'augmentation de taille des baies de raisin. La croissance des baies se fait en deux phases sigmoïdales. La première phase correspond à la croissance herbacée (ou végétative). La véraison se produit au terme de celle-ci, déclenchant la deuxième phase de développement de la baie, la maturation.

### **II.2.7.- Suivi de la croissance des baies de raisins (*Vitis*)**

Le volume des baies de raisin est estimé tous les cinq jours de manière non destructive à partir du 10<sup>ème</sup> jour après la fécondation jusqu'à la récolte (environ 90 jours après la fécondation). Pour cela, la grappe est introduite dans un pot en verre marqué d'un trait de jauge, puis le récipient est rempli d'eau jusqu'au trait de jauge, la différence de volume entre le pot plein avec et sans la grappe permet d'estimer le volume de cette dernière. Afin d'augmenter la précision de ces mesures, il est important de prendre des pots de dimension adaptée à la taille de la grappe. Pour ces expériences, trois pots d'un volume de 200, 300 et 750ml ont été utilisés.

### ***II.2.8.- Titration acide et dosage en potassium du moût de raisin (*Vitis*)***

Les baies à partir desquelles le moût est extrait, sont récoltées cinq jours après avoir atteint leur deuxième plateau de croissance (voir figures I.11 et II.2). Les baies de chaque grappe sont coupées au niveau du bourrelet du pédicelle. Puis les baies, hétérogènes au sein d'une même grappe, sont triées en fonction de leur densité. Pour cela elles sont immergées dans des bains contenant de 100 à 170 g de chlorure de sodium par litre d'eau, avec une différence de 10 g par litre entre deux bains. Les baies surnageant dans chacun de ces bains successifs sont regroupées et forment une "classe de densité". Chaque classe de densité, reflétant une teneur en sucre différente, est ensuite dénombrée et pesée. Les classes majoritaires issues des grappes d'un même plant sont regroupées et broyées.

Le broyage se fait en trois étapes. La première étape permet d'extraire la plus grande partie du moût, pour cela les baies sont placées sur une grille en aluminium à maille large (environ 0.5 mm) collée au fond d'un bêcher en plastique de 1 litre puis elles sont pressées énergiquement contre cette grille à l'aide d'un presse purée. Cinq cents microlitres de moût sont récupérés afin d'en estimer la teneur en alcool potentielle (TAP) à l'aide d'un réfractomètre portable. Pour permettre une meilleure extraction des acides organiques et du potassium, de l'eau osmosée à raison de 5 fois la masse des baies broyées est ajoutée dans le bêcher et un nouveau broyage avec le presse purée est effectué. La dernière étape consiste à filtrer le moût sur de la toile à bluter. Le marc retenu par la toile est pressé manuellement afin de récupérer les dernières gouttes de moût. L'extraction du moût par pressage à la toile à blutter permet d'extraire le jus contenu dans les cellules proches de la peau pouvant contenir jusqu'à 40 % du potassium total de la baie (Possner and Kliewer, 1985; Storey, 1987) et inaccessible par les autres modes de broyage.

Les moûts issus des trois broyages sont regroupés et homogénéisés par agitation. Afin de réaliser la titration acide permettant d'estimer l'acidité et le pouvoir tampon du moût, 15 mL du filtrat sont prélevés. Après avoir noté le pH initial du jus de raisin, du KOH 0.1 M est ajouté jusqu'à l'obtention d'un pH de 8.3. La quantité de base ajoutée reflète le pouvoir tampon du moût, lié aux teneurs des différents acides organiques de la baie.

Le reste du moût est stocké à -40°C pour le dosage du potassium et des acides organiques majoritaires (acide malique et acide tartrique).

### ***II.2.9.- Dosage du potassium et des acides organiques (*Vitis*)***

Le moût de raisin qui contient entre 20 et 50 mM de potassium est dilué 200 fois afin d'être dosé par spectrophotométrie de flamme (SpectrAA 220 FS, Varian). Une première dilution de 10 fois est réalisée par ajout d'une solution acide (HCl 0,1 N) pour permettre l'extraction du potassium complexé avec les acides tartriques et maliques. Puis une deuxième dilution au vingtième est obtenue par ajout d'eau distillée.

Le dosage des acides organiques a été réalisé par Bénédicte Pages (équipe œnologie, Domaine de Pech-Rouge, Narbonne) par HPLC (dionex DX100 monté sur colonnes anioniques Carbo-Pack PA1, éluant Carbonate/Soude).

## **II.3.- Electrophysiologie**

### ***II.3.1.- Obtention des protoplastes de cellules de garde (*Arabidopsis*)***

Les protoplastes sont préparés à partir de feuilles de rosettes de plantes âgées de 20 à 25 jours ayant poussé en chambre de culture jours courts (§ II.1.1). Seules les feuilles des plantes saines sont utilisées, une plante ayant subit un stress physique (broutage par des

insectes, feuille cassée) modifie la composition de sa paroi et les protoplastes deviennent très difficiles à patcher.

### **Protocole 1 :**

La nervure centrale des feuilles prélevées est découpée au scalpel. Les limbes sont broyés pendant 30s dans un waring blender contenant 50 mL d'eau osmosée. Le broyat est passé sur un filtre nylon (maille de 200 µm). Le broyage ayant fait éclater les cellules mésophylliennes, le passage sur filtre permet de retenir des lambeaux d'épidermes (cellules épidermiques et cellules de garde). Les cellules épidermiques sont libérées par une première digestion ménagée de 30 minutes dans un bain à 28°C dans 1 mL de solution contenant ( $\text{CaCl}_2$  1 mM, K-glutamate 1 mM, acide ascorbique 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, Cellulysine 0.7% m.v<sup>-1</sup>, Polyvinylpyrrolidone 40 0.1% m.v<sup>-1</sup>, BSA 0.25% m.v<sup>-1</sup>, MES-KOH 5 mM (pH 5.5), l'osmolarité étant ajustée à 300 mOsmol par du mannitol). Les épidermes sont de nouveau filtrés et abondamment rincés par une solution de mannitol 450 mM. Puis les épidermes sont remis à digérer 40 minutes à 20°C dans une solution contenant ( $\text{CaCl}_2$  1 mM, K-glutamate 1 mM, acide ascorbique 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, BSA 0.25% m.v<sup>-1</sup>, cellulase onosuka RS 1% m.v<sup>-1</sup>, pectolyase Y23 0.1% m.v<sup>-1</sup>, MES-KOH 5 mM (pH 5.5), l'osmolarité étant ajustée à 450 mOsmol par du mannitol). Les protoplastes de cellules de garde sont isolés par passage sur un filtre nylon à maille de 50 µm. Après 15 min permettant la sédimentation des protoplastes, le surnageant est remplacé par de la solution de bain fraîche ( $\text{CaCl}_2$  20 mM, K-glutamate 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, MES-KOH 10 mM (pH 5.5), l'osmolarité étant ajustée à 500 mOsmol avec du mannitol), de façon à éliminer totalement les enzymes de digestion. Les protoplastes sont ensuite conservés sur la glace et utilisés pour les enregistrements électrophysiologiques dans les 10 heures qui suivent. Ce protocole est une légère adaptation des protocoles utilisés classiquement dans les autres laboratoires (laboratoire d'Alain Vavasseur, CEA de Cadarache; laboratoire d'Enrico Martinoia, Zurich), il est assez long mais permet d'obtenir une grande quantité de protoplastes de cellules de garde ainsi qu'une très faible contamination par d'autres types cellulaires (mésophylle et épiderme). Cependant, ces paramètres ne sont pas essentiels pour une expérience de patch sur cellule de garde, c'est pour cela qu'un nouveau protocole, beaucoup plus rapide et plus simple a été mis en place.

### **Protocole 2 :**

Des fragments d'épiderme foliaire sont détachés à la pincette, puis répartis dans 2 tubes Eppendorf contenant chacun 1 mL d'une solution permettant la digestion de la paroi cellulaire. Cette solution contient  $\text{CaCl}_2$  1 mM, acide ascorbique 2 mM, 1% (masse/volume) de cellulase (Onosuka, type RS, Japon), 0.1% (masse/volume) de pectolyase (Seishin Pharmaceutical, type Y23, Japon), MES-KOH 1 mM (pH 5.5). L'osmolarité de cette solution est ajustée à 460 mOsmol avec du mannitol. La digestion est effectuée dans un bain-Marie agité à 27°C pendant 40 min. Puis les protoplastes (cellules épidermiques, cellules du mésophylle et cellules de garde) sont séparés des tissus non digérés par passage sur un filtre de 50 µm. Enfin les protoplastes sont mis dans la solution de bain (composition décrite dans le protocole 1) permettant de fixer la pipette de patch aux cellules. Cinq volumes (i.e., 5 mL par mL de solution de digestion) de solution de bain sont versés sur le filtre afin de diluer rapidement les enzymes de digestion. La suspension de protoplastes est alors répartie dans des tubes Eppendorf placés dans de la glace. Après 15 minutes permettant la sédimentation des protoplastes, le surnageant est remplacé par de la solution de bain fraîche, de façon à éliminer totalement les enzymes de digestion. Les protoplastes sont ensuite conservés dans de la glace, et utilisés pour les enregistrements électrophysiologiques dans les 10 heures qui

suivent. Les protoplastes de cellules de garde sont aisément identifiables parmi les autres protoplastes grâce à leur morphologie (petite taille et petits chloroplastes).

### ***II.3.2.- Obtention des protoplastes de tabac***

Le protocole d'obtention des protoplastes de tabac est basé sur celui décrit dans (Lukaszewicz, 1998). De jeunes feuilles de plantes cultivées *in vitro* (§ II.1.5) sont coupées au scalpel et abrasées sous hotte par du papier à poncer n°1200 (grain très fin). Les feuilles sont ensuite déposées à plat dans une boîte de Petri contenant 10 mL de solution de digestion composée de  $\text{CaCl}_2$  5 mM, saccharose 0.5 M, BSA 0.1% m.v<sup>-1</sup>, macerozyme R-10 0.125% m.v<sup>-1</sup> (Onozuka; Yakult Pharmaceutical), cellulase R-10 0.2% m.v<sup>-1</sup> (Onozuka; Yakult Pharmaceutical), MES-KOH 5 mM (pH 5.2). La digestion se fait à l'obscurité pendant 15 heures dans une pièce climatisée à 25°C. Après la digestion, 4 mL de milieu de flottaison ML06 sont ajoutés dans la boîte de Petri ( $\text{CaCl}_2$  15 mM, saccharose 0.6 M, MES-KOH 7.5 mM pH 6.0). La suspension de protoplastes est passée sur filtre nylon de 100 µm de largeur de maille. Le filtrat est centrifugé à 700 rpm (110g) pendant 7 minutes. Les protoplastes vivants restent en surface alors que les cellules mortes et les débris cellulaires tombent dans le culot. La bande de surface est prélevée et diluée 3 à 5 fois dans un tampon de lavage W5 (NaCl 154 mM,  $\text{CaCl}_2$  125 mM, KCl, 5 mM and glucose 5 mM, MES-KOH 1.5 mM pH 5.6). Les cellules sont ensuite culotées par une autre centrifugation à 110 g pendant 7 minutes puis relavées par 40 puis 20 mL de solution mannitol/Mg ( $\text{MgCl}_2$  15mM, 0.4 M mannitol, Mes-KOH 5 mM pH 5.6). Les protoplastes sont finalement resuspendus dans cette solution à une concentration d'environ  $10^6$  cellules par millilitre.

### ***II.3.3.- Transformation des protoplastes de tabac***

Dans un tube Eppendorf, 150 µL de protoplastes concentrés et 150 µL d'une solution de PEG (25% m/v PEG 6000, mannitol 0.4 M,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  100 mM, pH 5.6) sont additionnés de 5 µg d'ADN plasmidiques de la construction à tester. Le tube est gardé à température ambiante pendant 30 minutes à l'obscurité. Puis 8 mL de milieu K3M (voir composition tableau 1, Negruțiu et al., 1992) sont ajoutés lentement (ml/ml). Une centrifugation de 7 minutes à 110 g permet de culotter les cellules, elles sont enfin ressuspensionnées dans 3 mL de solution K3M et incubées à l'obscurité pendant 12 heures à 20°C.

### ***II.3.4.- Electrophysiologie sur protoplastes***

La conductance membranaire des protoplastes est étudiée en enregistrant les courants transmembranaires par application de la technique du "patch-clamp" en configuration cellule entière (Hamill et al., 1981), figure II.3).

#### ***Electrodes de mesure***

Les pipettes sont obtenues à partir de capillaires en boro-silicate de 10 cm de longueur et de 1.5 à 1.8 mm de diamètre (Kimax-51, Kimble Glass, Inc, Owens, IL). Ces capillaires subissent un étirement horizontal contrôlé par une étireuse Sutter P-97 (Sutter Instruments Inc., Novato, CA). Le capillaire est centré au milieu d'un filament de tungstène à travers lequel circule un courant électrique (5 à 25 A). Le filament chauffe et provoque la fusion partielle du verre. L'intensité du courant et la durée de son application sont contrôlées par un microprocesseur selon un programme défini par l'utilisateur. Une force horizontale d'intensité et de durée variable est ensuite appliquée aux extrémités du capillaire afin de l'étirer. Les pipettes utilisées pour les expériences sur protoplastes sont obtenues grâce à trois étirements successifs, leur résistance, qui dépend de la solution de pipette et de bain utilisée, est précisée dans le matériel et méthode des articles.

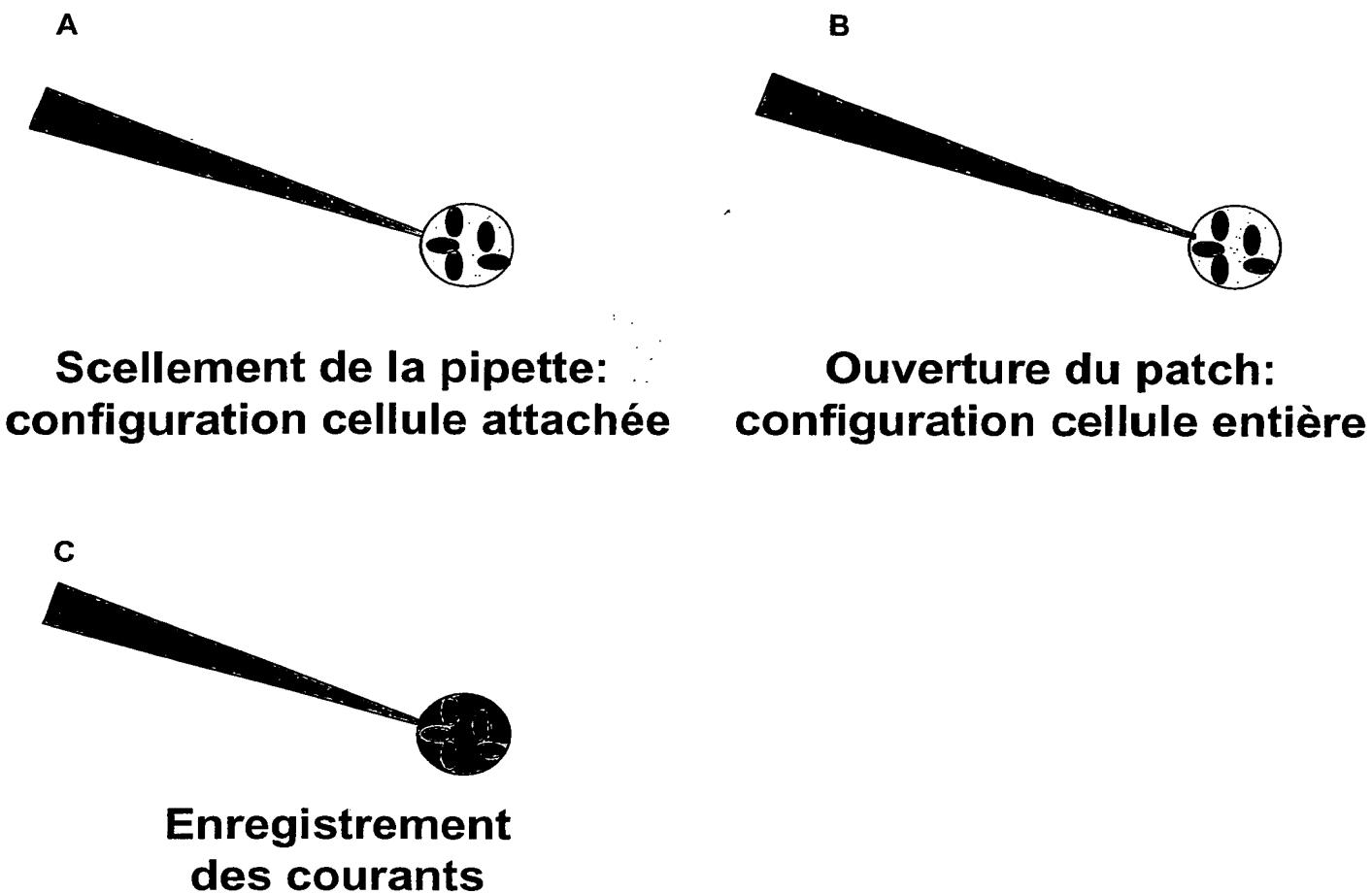
### ***Obtention du scellement de la pipette à la cellule***

A l'aide d'un micromanipulateur, la pipette est approchée de la membrane plasmique du protoplaste. En appliquant une légère succion, on crée une dépression dans la pipette, permettant l'adhésion de la membrane du protoplaste à l'électrode en verre. Une résistance de contact de plusieurs giga-ohms s'établit suite à cette succion (figure II.3). La qualité de ce scellement est évaluée en mesurant la résistance électrique du circuit de mesure (procédure offerte par l'amplificateur de patch-clamp, Axopatch 200A équipé d'une tête CV-201 A, Axon Instruments Inc., Foster City, CA).

### ***Configuration cellule entière***

La configuration obtenue après le scellement est appelée "cellule attachée". Pour passer en configuration "cellule entière" permettant les enregistrements macroscopiques reflétant l'activité des canaux présents sur la totalité de la membrane plasmique, il faut rompre le patch de membrane situé à la pointe de la pipette (figure II.3). Pour cela on dispose de deux moyens, une succion brève et intense, ou une impulsion de courant. Il est préférable de n'en utiliser qu'un dans un premier temps afin de ne pas perdre le scellement, et seulement en cas de difficulté, le cumul des deux moyens est possible.

Une fois en mode cellule entière, des courants capacitifs apparaissent, ceux ci sont dus au fait que la bicoche lipidique formant la membrane de la cellule agit comme un condensateur. Ces courants capacitifs peuvent gêner les analyses, c'est pour cela qu'il faut les compenser en réglant le potentiomètre de la section "électrode capacitance compensation" situé sur l'amplificateur. Cette compensation est indispensable pour les expériences réalisées sur protoplastes de tabac, car la surface membranaire est importante et les courants très intenses. En ce qui concerne les cellules de garde, il est très difficile de faire la compensation des courants capacitifs car ils sont peu intenses. Les protoplastes de cellules de garde étant très petits, et l'intensité des courants enregistrés assez élevée, il n'est donc pas essentiel de compenser ces courants.



**Figure II.3: Obtention d'un scellement et passage en mode cellule entière**

Par une brève succion, la cellule est scellée à la pipette (A). Puis le patch de membrane situé à la pointe de la pipette est cassé (B). Après quelques minutes, la solution de pipette (de composition connue) a remplacé le cytoplasme: l'enregistrement des courants peut commencer avec une membrane baignée par deux phases liquides de composition déterminée (C).

#### **Solutions utilisées pour les enregistrements**

La solution de remplissage des pipettes (i.e., le milieu intracellulaire en configuration cellule entière) contient : K-glutamate 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, EGTA 5 mM (ajustement de la concentration de calcium libre à 50 nM), Mg-ATP 2 mM, Hepes-KOH 10 mM (pH 7,5). L'osmolarité est ajustée à 520 mOsmol avec du mannitol.

Le scellement de la pipette à la membrane cellulaire est réalisé dans une solution "de bain" riche en calcium (20 mM pour les protoplastes de cellules de garde, 10 mM pour les protoplastes de tabac). Le calcium permet de stabiliser les membranes lors du scellement. Trop peu de calcium entraîne un passage en configuration cellule entière avant l'obtention d'une forte résistance du scellement, empêchant la formation de ce dernier, en

contrepartie un excès de calcium gêne l'ouverture du patch et donc le passage en mode cellule entière. La composition des solutions de bain est :

(1) pour les protoplastes de cellules de garde d'*Arabidopsis* : CaCl<sub>2</sub> 20 mM, K-glutamate 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, MES-KOH 10 mM (pH 5,5), l'osmolarité étant ajustée à 500 mOsmol avec du mannitol

(2) pour les protoplastes de mésophylle de tabac : CaCl<sub>2</sub> 10 mM, K-glutamate 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, MES-KOH 10 mM (pH 5,5), l'osmolarité étant ajustée à 480 mOsmol avec du mannitol

### **Acquisition et l'analyse des signaux**

Le logiciel utilisé est pClamp (version 6.0.3, Axon Instruments Inc.).

Les courants sont mesurés d'abord dans la solution de bain puis dans d'autres solutions différent par leur concentration en K<sup>+</sup>, et/ou l'adjonction d'inhibiteurs des canaux potassiques (Césium, TEA, etc.). L'utilisation du glutamate (anion imperméant) dans la solution de remplissage permet de limiter la concentration d'ion chlorure et donc les courants entrants correspondant à un efflux de Cl<sup>-</sup>.

#### **II.3.5.- Protocoles d'enregistrement**

Les protocoles d'enregistrement correspondent à la succession de potentiels imposés à la membrane une fois en configuration cellule entière afin d'activer ou de désactiver les canaux. Ces protocoles sont modifiés régulièrement en fonction des canaux et des cellules étudiés. Cependant, deux protocoles types peuvent être définis. Des protocoles à deux phases permettant l'étude des courants issus de l'activation des canaux, et des protocoles à trois phases, appelés protocole de queue permettant l'étude de la désactivation des canaux (Figure II.4). Pour chacun de ces protocoles, le potentiel de repos (HP), la durée du pulse de voltage, les potentiels maximum et minimum appliqués, ainsi que les sauts de potentiels sont modifiés selon les expériences (ces variations sont précisées dans les légendes des figures).

#### **Protocole à deux phases**

Ce protocole comprend habituellement 8 épisodes hyperpolarisants ou dépolarisants, et le potentiel de maintien est fixé à -40 mV (sauf pour les études sur le canal AKT1 où le HP est fixé à 0 mV car le canal est actif à -40 mV). Après 1 s au potentiel de maintien, un premier saut de potentiel de 2 s de + ou - 20 mV (pour étudier les canaux activés respectivement par la dépolarisation ou par l'hyperpolarisation) est effectué, puis un retour de 1 s au potentiel de maintien permet la désactivation des canaux. Ensuite, un deuxième saut de + ou - 40 mV est imposé, suivi d'un retour au HP. Ceci 8 fois avec un écart de potentiel (pas du protocole) de 20 mV entre chaque pulse, afin de couvrir des potentiels allant de -20 mV à +120 mV pour les protocoles dépolarisants et de -60 mV à -200 mV pour les protocoles hyperpolarisants.

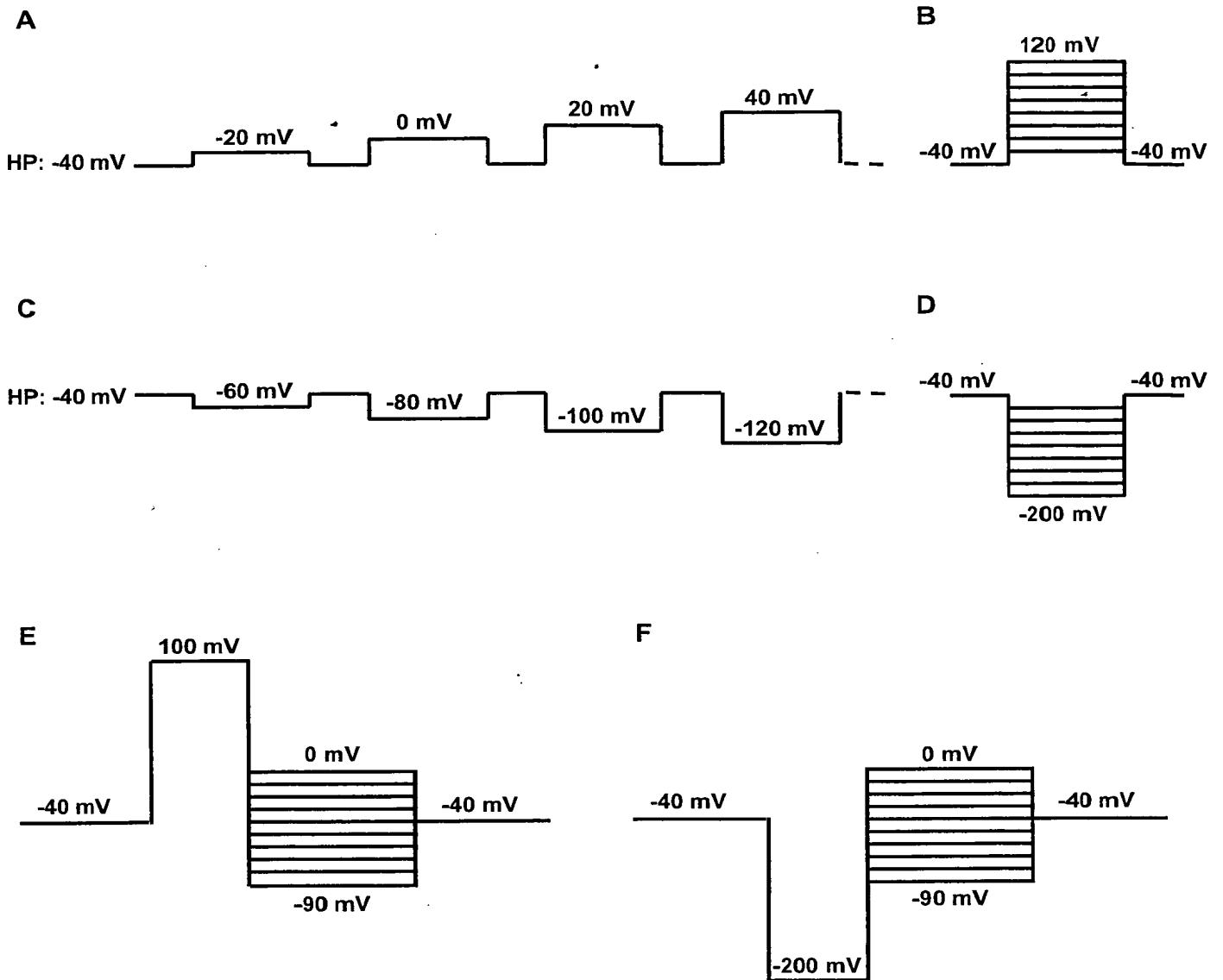
#### **Protocole de queue**

Ce protocole permet d'étudier les caractéristiques de sélectivité des canaux étudiés. Pour cela, les canaux sont activés par un prépulse très dépolarisant ou très hyperpolarisant, puis des potentiels variables sont appliqués afin de regarder avant la désactivation des canaux, le potentiel d'inversion des courants. Ce potentiel étant lié aux rapport de sélectivité des ions passant à travers le pore des canaux activés, il est possible en modifiant les concentrations ioniques des solutions, d'estimer la sélectivité des canaux et donc la composante ionique formant les courants. Pour cela on utilise l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz :

$$E = -\frac{RT}{ZF} * \frac{\sum_i E_i * g_i}{\sum_i g_i} \approx -\frac{RT}{ZF} * \frac{(E_K * g_K) + (E_{Na} * g_{Na}) + (E_{Cl} * g_{Cl})}{g_K + g_{Na} + g_{Cl}}$$

Ou  $E_i$  est le potentiel d'inversion de l'ion  $i$  calculé à partir de l'équation de Nerst ( $E_i = RT/F \cdot \ln(K_{ext}/K_{int})$ ),  $g_i$  la conductance membranaire totale pour l'ion  $i$  et  $z$  la valence de l'ion.

Ce protocole à dix épisodes débute par un pulse d'une seconde au potentiel de repos, puis un pulse de voltage très négatif (-180 mV) ou très positif (+100) est appliqué pendant 750 ms. Enfin, pendant la troisième phase qui dure 1250 ms, le voltage prend une valeur différente pour chaque épisode. Ces valeurs sont centrées autour du  $E_K$  théorique et le pas entre chaque épisode est de + ou - 10 mV.



**Figure II.4: Différents protocoles d'enregistrement des courants**

Représentations décomposées (A et C), et condensées (B et D) des protocoles à deux phases permettant l'étude des canaux activés par des potentiels dépolarisants (A et B), ou hyperpolarisants (C et D). Représentations condensées des protocoles de queue permettant l'étude de la sélectivité des canaux activés par la dépolarisation (E) ou par l'hyperpolarisation membranaire (F).

## **II.4.- Obtention de plantes d'*Arabidopsis* transgéniques**

### ***II.4.1.- Transformation des Arabidopsis***

La souche d'*Agrobactérium tumefaciens* utilisée est la souche MP90 résistante à la rifampicine et contenant un plasmide lui conférant la résistance à la gentamycine. Le vecteur binaire (pBIB hygro) utilisé pour transformer les agrobactéries et portant les gènes chimères destinés à être introduits dans le génome des plantes confèrent aux bactéries et aux plantes transgéniques une résistance à l'hygromycine.

### ***II.4.2.- Constructions utilisées***

Les promoteurs des différents gènes étudiés, les ADNc portant la mutation dominante négative, ainsi que les clonages dans le plasmide pBIB-hygro ont été réalisés et obtenus au laboratoire par Ingo Dreyer.

### ***II.4.3.- Préparation d'agrobactéries compétentes***

Les agrobactéries sont mises en culture à 30°C durant une nuit dans du LB contenant 25 µg.mL<sup>-1</sup> de gentamycine et 50 µg.mL<sup>-1</sup> de rifampicine. La culture est diluée 100 fois dans 200 mL de LB gentamycine-rifampicine et remise en culture 4 heures. Les bactéries sont sédimenées par une centrifugation de 20 min à 4500 g et resuspendues dans 10 ml de TE froid (Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, pH 8). Après une nouvelle centrifugation de 20 min elles sont resuspendues dans 20 mL de LB froid. La suspension de bactéries est alors aliquotée, congelée dans l'azote liquide et stockée à -80°C.

### ***II.4.4.- Transformation des agrobactéries compétentes***

Cinq microgrammes d'ADN plasmidique pBIB-hygro sont mélangés à 500 µl de suspension d'agrobactéries compétentes préalablement décongelée dans de la glace (10 minutes). Puis le mélange est plongé 1 min dans de l'azote liquide et incubé 5 min à 37°C avant d'ajouter 500 µL de LB. Les agrobactéries sont alors mises en culture à 30°C pendant 4 heures, puis étalées sur du milieu LB gélosé contenant 25 µg.mL<sup>-1</sup> de gentamycine, 50 µg.mL<sup>-1</sup> de rifampicine et 50 µg.mL<sup>-1</sup> d'hygromycine. Les colonies de bactéries transformées apparaissent après 2 jours d'incubation à 30°C.

### ***II.4.5.- Transformation des plantes d'*Arabidopsis* par infiltration selon la méthode de Clough et Bent (1998)***

Une culture d'agrobactéries de 500 ml est réalisée dans du LB-hygromycine à partir d'une préculture en croissance depuis 12 h dans du LB-rifampicine-gentamycine-hygromycine. Après une nuit de culture, les bactéries sont sédimenées par une centrifugation de 15 min à 4500 g puis resuspendues dans 400 mL d'une solution de saccharose 5% et silwett L-77 0,5% (Witco, Organosilicone group, CH). Les plantes à transformer doivent avoir développé une hampe florale de 10 cm environ. Les hampes sont trempées 2 fois 2 minutes dans la suspension bactérienne (Clough and Bent, 1998). Les plantes sont ensuite maintenues 24 heures dans une atmosphère saturée en humidité à l'abri d'un éclairage intense, puis placées dans la serre jusqu'à l'obtention des graines.

#### ***II.4.6.- Stérilisation des graines d'Arabidopsis et sélection des lignées homozygotes***

Les graines récoltées sont stérilisées sous hotte à flux laminaire par agitation 15 minutes dans 1 mL de solution de stérilisation ( $\frac{1}{2}$  cachet de bayrochlore dissous dans 40 mL d'éthanol 50 % v/v), puis sont lavées trois fois avec de l'éthanol absolu. Après avoir séché sous hotte, elles sont semées sur boîte de Petri contenant un milieu MS dilué deux fois (Murashige et Skoog, 1962, Sigma M5524) additionné de saccharose 1%, MES-KOH 0.5 g.L<sup>-1</sup> pH 5.7 et hygromycine à 30 µg.L<sup>-1</sup> (gène de résistance présent dans l'ADN-T). Les boîtes sont scellées par du parafilm puis placées en chambre de culture. Les transformants qui ont inséré l'ADN-T portant le gène de résistance à l'hygromycine se développent normalement sur le milieu de sélection tandis que les non-transformants se chlorosent dès le début du stade cotylédonaire. Après une semaine sur ce milieu de sélection, les plantes résistantes sont transférées sur terreau pour qu'elles puissent achever leur développement. Ces plantes (génération T1) sont toutes hémizygotes vis à vis de l'insertion (et donc de la mutation). Un nouveau cycle de récolte, stérilisation et semis sur milieu sélectif des graines de chaque plante résistante permet d'isoler pour chaque transformant primaire une vingtaine de plantes résistantes. Ces plantes de la T2 sont hétéro- ou homo-zygotes pour l'insertion. Les graines de la T3 sont récoltées plante à plante, stérilisées et semées sur milieu sélectif à raison d'une centaine de graines par boîte de Petri. Après une semaine, la détermination du rapport entre le nombre de plantes résistantes et celui de plantes sensibles à l'antibiotique permet d'isoler les lignées homozygotes et mono-insertionnelles (test "3/4 - 1/4"). Pour les mutants knock-out des réactions PCR utilisant des amorces encadrant l'insertion permettent de vérifier l'homozygotie.

### **II.5.- Biologie Moléculaire**

#### ***II.5.1.- Southern***

##### ***Extraction d'ADN génotypique***

Des rosettes de plantes âgées de quatre à six semaines cultivées sur terreau en chambre de culture jours courts sont prélevées puis broyées dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Du tampon d'extraction à raison de 4 mL par gramme de matière fraîche (CTAB 2 %, NaCl 1.4 M , EDTA 20 mM, Tris 0.1 M pH 8, β-mercaptoproéthanol 0.2 % v/v) est mélangé au broyat. Après homogénéisation l'ensemble est incubé 30 minutes à 60°C. Les débris cellulaires et les protéines en solution sont éliminés par ajout d'un volume de C/I (chloroforme/alcool isoamylique, 24/1 v/v) suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 15000 g. La phase aqueuse est récupérée et les acides nucléiques qu'elle contient sont précipités par l'addition d'un volume d'isopropanol suivi d'une centrifugation de 20 minutes à 15000 g (précipitation isopropanolique). Après deux lavages à l'éthanol 70%, le culot d'ADN est repris dans 500 µL de TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, pH 8). Les ARN présents dans la suspension d'ADN sont dégradés par l'action de 50 µg de RNase A à 37°C pendant une heure. L'enzyme est ensuite éliminée par un traitement au P/C/I (phénol/chloroforme/alcool isoamylique, 24/25/1 v/v/v) suivi de deux traitements successifs au C/I. La phase aqueuse contenant les acides nucléiques est additionnée de 20 µL d'acétate de sodium 3 M, pH 4.8, et de 600 µL d'éthanol absolu. Après deux heures à -20°C, une centrifugation de 20 minutes à 13000 g permet la précipitation de l'ADN (précipitation éthanolique).

Le culot, lavé deux fois à l'éthanol 70 %, est repris dans 20 µl de TE. La quantité d'ADN purifié est estimée par dosage d'1 µl sur gel d'agarose (0,8 % p/v) dans un tampon TAE (tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.5) en présence de BET (bromure d'éthidium à 0,05 µg.mL<sup>-1</sup> de gel). L'intensité de la bande obtenue est comparée à celle d'un marqueur de concentration connue (la bande à 23 kb de l'ADN digéré du phage lambda étant concentrée à 12.5 ng.µL<sup>-1</sup>).

### **Digestion de l'ADN génomique**

L'ADN génomique (environ 5 µg) est digéré pendant 6 heures par 40 unités d'enzymes de restriction, à la température d'activité optimale de l'enzyme dans une solution tamponnée spécifique de l'enzyme (20 µL), additionnée de 0.1 mg.ml<sup>-1</sup> de BSA (volume final 200 µl). Les enzymes de restriction sont éliminées de la préparation d'ADN par traitements successifs au P/C/I et C/I. Les fragments d'ADN sont ensuite récupérés par précipitation éthanolique puis le culot est repris dans 20 µl d'eau.

### **Transfert des fragments d'ADN sur une membrane de nylon**

Les ADN digérés, additionnés de 2 µl de tampon de charge 6X (EDTA 100 mM pH 8 ; glycérol 50 % v/v ; H<sub>2</sub>O 30 % v/v ; xylène cyanole 125 % p/v ; bleu de bromophénol 125 % p/v) sont séparés par migration sur gel d'agarose 0.8 % toute une nuit. Le lendemain, les fragments d'ADN sont partiellement dépurinés en trempant le gel 30 minutes dans un bain de HCl 0.25 N. Le gel est ensuite rincé trois fois 5 minutes à l'eau distillée, puis il est plongé 30 minutes dans du tampon de dénaturation (NaCl 1.5 M ; NaOH 0.5 M). Après 2 nouveaux rinçages à l'eau de 5 minutes, les fragments d'ADN sont stabilisés en plongeant le gel deux fois 15 minutes dans du tampon de neutralisation (TRIS pH 7.2 0.5 M, NaCl 1.5 M, EDTA 1 mM). Le gel est finalement rincé brièvement dans du SSC 10 X (Standard Saline Citrate : NaCl 1.5 M, tri-sodium citrate 150 mM).

Les fragments d'ADN contenus dans le gel d'agarose sont transférés par capillarité sur une membrane de nylon chargée positivement. Pour cela, deux bandes de papier Whatman imbibées de SSC 10 X sont posées sur un pont surplombant une cuve plastique contenant du SSC 10 X. Les extrémités des bandes trempant dans la cuve de part et d'autre du pont permettent d'imbiber le papier pendant toute la durée du transfert. Le gel est posé sur le papier Whatman (puits vers le bas), et une membrane de nylon imbibée de SSC 2 X est plaquée sur celui-ci. Deux feuilles de papier whatman imbibées de SSC 2 X ainsi que plusieurs feuilles de papier absorbant recouvrent le tout. Pendant toute la nuit, le flux de solution de SSC 10X de la cuve vers le papier absorbant va permettre le transfert des fragments d'ADN du gel vers la membrane. Une fois le transfert achevé, la membrane est rincée dans du SSC 2 X, et les ADN y sont fixés par une exposition de 2 minutes aux U.V. (234 nm). Sèche, la membrane peut être conservée à 4°C pendant plusieurs jours.

### **Hybridation de la membrane**

La membrane sèche est imbibée dans du SSC 2 X puis est plaquée sur les parois internes d'un tube de verre. Les sites de fixation aspécifiques de la membrane sont saturés par une préhybridation de 2 h à 42 °C dans du tampon formamide (10 % de dextran sulfate p/v, SSC 5 X, sarkosyl 0.8 X, formamide déionisé 50 % v/v) additionné de sperme de saumon soniqué et dénaturé par chauffage à 95°C. La sonde utilisée pour l'hybridation est rendue radioactive par "random priming" : 30 ng de sonde préalablement dénaturée sont amplifiés une heure à température ambiante dans 50 µL de tampon (10 µl de labelling buffer 5 X (Tris-HCl 250 mM (pH 8), MgCl<sub>2</sub> 25 mM, DTT 2 mM, HEPES 10 M (pH 6.6), random hexadéoxyribonucléotides 26 A<sub>260</sub> u.mL<sup>-1</sup>), 2 nmoles de dGTP et de dTTP, 0.2 µg de BSA) auquel sont ajoutés 50 mCi de radionucléotides [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP et [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP et 8 unités

de Klenow DNA polymérase. Les sondes radiomarquées et les nucléotides non incorporés sont séparés sur colonne de Sephadex G50 (Nick Column, Pharmacia). Puis l'activité de la sonde est estimée par comptage (compteur à scintillation) de 2 µL d'éluat dans 3 mL de liquide scintillant. Une quantité de sonde radiomarquée correspondant à une activité de  $10^6 \text{ cpm.mL}^{-1}$  est dénaturée puis ajoutée au tampon de pré-hybridation. L'hybridation entre la sonde marquée et les ADN fixés sur la membrane de nylon dure toute une nuit à 42°C. La membrane subit ensuite différents lavages afin d'éliminer les sondes hybridées de manière aspécifique : 2 lavages de 10 minutes dans une solution SSC 2 X, SDS 0.1 % à température ambiante, 2 lavages de 20 minutes dans une solution de SSC 1 X, SDS 0.1 % dont un à température ambiante et l'autre à 42°C, et un dernier lavage de 20 minutes dans une solution de SSC 0.5 X, SDS 0.1 % à 42°C. Le lavage de la membrane est contrôlé à chaque étape avec un compteur Geiger et peut être interrompu si nécessaire. La membrane est protégée par un film plastique fermé hermétiquement afin de prévenir la prolifération de champignons. Elle est ensuite placée une semaine au contact d'un écran phosphoimageur (Storm) à température ambiante. Un scanner permet de révéler l'écran Storm. Les signaux détectés sont quantifiés à l'aide du logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

### **II.5.2.- Extraction d'ARN**

Un échantillon végétal (entre 0,5 et 1 g de matière fraîche) est broyé dans un mortier en présence d'azote liquide, puis homogénéisé 5 min dans 5 mL de tampon d'extraction (guanidine-HCl 8 M, β-mercaptopropanoïde 50 mM, EDTA 20 mM et MES 20 mM, pH 7). Après une centrifugation de 15 min pour éliminer les débris cellulaires, le surnageant est mélangé à 5 mL de PCI afin d'extraire les protéines. Après 10 min d'agitation, les phases aqueuses et organiques sont séparées par centrifugation (20 min, 9000 × g, 4°C). Les acides nucléiques présents dans la phase aqueuse sont précipités pendant 2 h à -20°C après ajout d'acéate de sodium 3 M pH 4,8 (1/10 v/v) et d'isopropanol (1/1 v/v). Une centrifugation de 30 min à 10000 × g et à 4°C permet de sédimenter les acides nucléiques, qui sont ensuite lavés par de l'éthanol (70%) puis solubilisés dans 1 mL d'eau traitée par du DEPC. Du LiCl 10 M (250 µL) est ajouté pour précipiter les ARN. La précipitation dure une nuit à 0°C. Après une centrifugation de 30 min (10000 × g, 4°C), le culot d'ARN est lavé par de l'éthanol (70%), puis solubilisé dans 100 µL d'eau préalablement traitée par du DEPC. La concentration des ARN est déterminée par spectrophotométrie à 260 nm.

### **II.5.3.- Reverse transcription**

Dix µg d'ARN totaux sont incubés à 70°C pendant 5 minutes en présence de 5 pmoles d'oligonucléotide poly(T) dans un volume de 10 µL. Après ce traitement à forte température permettant d'enlever les structures secondaires des ARN, le tube est plongé dans de la glace. Cinq µL de tampon de réaction fourni avec l'enzyme (375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 250 mM Tris-HCl pH 8.3), 12.5 nM de chaque nucléotide, et 200 unités de M-MLV Reverse Transcriptase (Promega m3682) sont ensuite ajoutés, dans un volume final de 25 µL. Après un mélange par inversion, le tube est incubé à 37°C pendant 1 heure. Le second brin d'ADN est ensuite synthétisé par une réaction PCR classique.

### **II.5.4.- Amplification par PCR**

Les fragments d'ADN sont amplifiés par la technique de PCR à l'aide de la polymérase thermostable de *Thermus brockianus* (ExtraPol I, Eurobio). Le mélange réactionnel (50 µL) contient du tampon de réaction fourni avec l'enzyme (Tris-HCl 10 mM pH 8.8, KCl 50 mM, Triton X100 0,1 %), 2,5 mmol.l<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 unités d'ExtraPol I, 200 µmoles.l<sup>-1</sup> de

chacun des déoxynucléotides triphosphates (dNTP), 5 pmoles de chaque amorce nucléotidique, et de 0.1 à 50 ng de matrice. Le protocole d'amplification comporte un traitement de 5 min à 95°C permettant la dénaturation des fragments d'ADN, suivi de 35 à 40 cycles imposés selon le protocole suivant : 45 s à 95°C; 1 minute à 65°C permettant l'hybridation de l'amorce avec l'ADN matrice (annealing) puis x min à 72°C permettant la synthèse de l'ADN. Le temps de synthèse varie en fonction de la longueur du fragment à amplifier: il est d'environ une minute par kpb d'ADN. La température d'hybridation (température d'annealing) ne reste pas fixée à 65°C, à chaque cycle pendant les dix premiers cycles, la température d'annealing est baissée d'un degré afin de baisser la spécificité d'hybridation. Le Tm des amorces PCR est calculé par la formule  $Tm = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$ , et sont choisies afin d'avoir un Tm de 60 +/-1°C.

## **III.- RESULTATS**

### **III.1.- Rôle du canal GORK dans la régulation des mouvements stomatiques et de la transpiration des plantes**

#### **III.1.1.- Présentation de l'article 1 :**

Les mouvements stomatiques permettent de réguler les flux entrants de CO<sub>2</sub> et les pertes d'eau par transpiration au niveau des feuilles. Leur régulation passe par une intégration de nombreux paramètres physiologiques (teneur en eau de la plante, balance hormonale) et environnementaux (teneur hydrique du sol et de l'air, quantité et qualité de la lumière, température). La complexité des voies de régulation des mouvements stomatiques, l'importance physiologique de ces mouvements et l'accessibilité des cellules constituant ces organes à la surface des feuilles ont fait du stomate un des organes végétaux les plus étudiés (MacRobbie, 1998; Schroeder et al., 2001).

Le stomate est constitué de deux cellules de garde d'allure réniforme liées entre elles à leurs extrémités, délimitant un pore central permettant les échanges gazeux d'eau et de CO<sub>2</sub> avec l'atmosphère. Ce pore s'agrandit quand les cellules de garde s'arquent suite à une entrée d'osmotica (essentiellement des sels de potassium et des sucres, Outlaw, 1983). L'importance du potassium en tant qu'osmoticum était admise bien avant que les mécanismes moléculaires de l'entrée et de la sortie de K<sup>+</sup> ne soient découverts. Ce n'est que dans les années 1980-90, que deux avancées majeures ont permis une meilleure compréhension des mécanismes sous-tendant les mouvements stomatiques : le clonage d'ADNc codant des canaux potassiques d'*Arabidopsis* par complémentation fonctionnelle de mutants de levure (Anderson et al., 1992; Sentenac et al., 1992) et l'invention du patch-clamp (Neher and Sakmann, 1976) suivie de son application à des protoplastes (Schroeder et al., 1984; Schroeder et al., 1987).

Le clonage et l'expression en système hétérologue des premiers canaux Shaker, a permis de faire un parallèle entre l'activité des canaux de cette famille, et les conductances de la membrane plasmique des cellules de garde, et donc de déterminer les éléments moléculaires responsables des flux de potassium. Trois canaux Shaker sont majoritairement exprimés dans les cellules de garde, KAT1, KAT2, et GORK (Nakamura et al., 1995; Ache et al., 2000; Kwak et al., 2001; Pilot et al., 2001; Szyroki et al., 2001). Les deux premiers sont des canaux permettant l'influx de potassium, et le dernier a été caractérisé, comme un canal d'efflux, entraînant donc la sortie de potassium hors de la cellule.

L'application de la technique de patch-clamp au matériel végétal a ouvert la voie à la caractérisation, au niveau moléculaire, des conductances ioniques présentes sur le plasmalemme des cellules de garde. Les résultats obtenus ont permis de confirmer l'existence de plusieurs types de canaux potassiques dépendants du potentiel de membrane. L'accès aux propriétés moléculaires de ces canaux grâce au patch-clamp a non seulement fait progresser la connaissance du mode de fonctionnement de ces canaux mais également a permis leur identification formelle (par single channel) offrant la possibilité de comparer les données obtenues *in situ* et celles obtenues par expression hétérologue de canaux clonés. Cette comparaison permet à la fois d'attribuer à un gène un type de canal, mais aussi de repérer des différences fonctionnelles entre les deux contextes (homo- et hétérologue) et par là de découvrir des régulations post-transcriptionnelles de l'activité des canaux.

L'identification des canaux exprimés dans les cellules de garde a permis de mettre en place des études de génétique inverse afin de tenter de déterminer le rôle exact des

canaux potassiques et du potassium dans les mouvements stomatiques. La première étude de ce type a été réalisée par le laboratoire de Rainer Hedrich sur des plantes présentant une disruption du gène *KAT1*. L'absence de phénotype a été attribuée à la redondance fonctionnelle des canaux *KAT1* et *KAT2* sur le plasmalemme des cellules de garde (Szyroki et al., 2001).

Nous avons, quant à nous, tenté de déterminer l'implication du canal Shaker GORK dans la conductance potassique sortante des cellules de garde, et le rôle de l'efflux de potassium dans les mouvements stomatiques. Pour cela, deux lignées mutantes ont été isolées. Une lignée knock-out *gork-1* pour laquelle l'expression du gène *GORK* dans la plante est supprimée par insertion d'un ADN-T dans le gène *GORK*, et une lignée *dn-gork-1*, qui exprime un gène *gork* chimérique codant une sous unité *gork* mutée dans le filtre de sélectivité du pore, conférant ainsi une activité de type dominant négatif au polypeptide qu'il code. L'expression du polypeptide muté permet l'inactivation des canaux GORK natifs mais aussi des autres canaux Shaker sortants pouvant être exprimés dans les cellules de garde par hétérotétramérisation.

L'analyse des courants potassiques présents sur la membrane des cellules de garde des plantes de chaque lignée a permis de constater (i) que GORK est le seul canal potassique voltage-dépendant sortant présent sur la membrane des cellules de garde, (ii) qu'il n'y a pas de compensation de la perte du canal GORK par l'expression d'un autre canal Shaker sortant, mais aussi que (iii) l'effet de la mutation dominante négative ne permet pas de supprimer la totalité des courants sortants de la cellule de garde.

Une étude physiologique a ensuite été menée afin de déterminer l'impact de la perte de la conductance potassique d'efflux sur les mouvements stomatiques. Les mesures de déshydratation des rosettes excisées ont permis de voir qu'il y avait une différence d'état stationnaire d'ouverture initiale, les études sur épidermes pelés ont révélé une altération des mécanismes de fermeture des stomates par l'obscurité et l'ABA, mais pas de l'ouverture à la lumière. Elles ont aussi mis en évidence le phénotype intermédiaire de la lignée dominante négative.

Enfin, des expériences sur plantes entières ont permis de préciser le rôle du canal GORK dans les mouvements stomatiques en cas d'irrigation suffisante, ou en cas de dessèchement du sol (ou présence d'ABA).

Cette étude permet de dire que le canal GORK catalyse la seule conductance potassique temps et voltage dépendante de la cellule de garde, et de façon surprenante, que les mécanismes de fermeture par l'acide abscissique et l'obscurité ne sont que faiblement dépendants de ces efflux de potassium contrôlés par le potentiel de membrane.

# The *Arabidopsis* outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration

Eric Hosy\*, Alain Vavasseur†, Karine Mouline\*, Ingo Dreyer\*‡, Frédéric Gaymard\*, Fabien Porée\*‡, Jossia Boucherez\*, Anne Lebaudy\*, David Bouchez§, Anne-Aliénor Véry\*, Thierry Simonneau¶, Jean-Baptiste Thibaud\*, and Hervé Sentenac\*||

\*Biochimie et Physiologie Moléculaires des Plantes, Unité Mixte de Recherche 5004, Agro-M/Centre National de la Recherche Scientifique/Institut National de la Recherche Agronomique/UM2, F-34060 Montpellier Cedex 1, France; †Commissariat à l'Energie Atomique Cadarache, Direction des Sciences du Vivant, Département d'Ecophysiology Végétale et Microbiologie, Laboratoire des Échanges Membranaires et Signalisations, Unité Mixte de Recherche 163, Centre National de la Recherche Scientifique/Commissariat à l'Energie Atomique/Univ-Méditerranée, F13108, St. Paul-Lez-Durance Cedex, France; and §Station de Génétique et Amélioration des Plantes, Institut National de la Recherche Agronomique Centre de Versailles, F-78026 Versailles Cedex, France; and ¶Laboratoire d'Ecophysiology des Plantes sous Stress Environnementaux, Unité Mixte de Recherche 759, Institut National de la Recherche Agronomique/Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier, 2 Place Viala, F-34060 Montpellier Cedex 1, France

Edited by Enid MacRobbie, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, and approved February 5, 2003 (received for review July 4, 2002)

**Microscopic pores present in the epidermis of plant aerial organs, called stomata, allow gas exchanges between the inner photosynthetic tissue and the atmosphere. Regulation of stomatal aperture, preventing excess transpirational vapor loss, relies on turgor changes of two highly differentiated epidermal cells surrounding the pore, the guard cells. Increased guard cell turgor due to increased solute accumulation results in stomatal opening, whereas decreased guard cell turgor due to decreased solute accumulation results in stomatal closing.** Here we provide direct evidence, based on reverse genetics approaches, that the *Arabidopsis* GORK Shaker gene encodes the major voltage-gated outwardly rectifying K<sup>+</sup> channel of the guard cell membrane. Expression of GORK dominant negative mutant polypeptides in transgenic *Arabidopsis* was found to strongly reduce outwardly rectifying K<sup>+</sup> channel activity in the guard cell membrane, and disruption of the GORK gene (T-DNA insertion knockout mutant) fully suppressed this activity. Bioassays on epidermal peels revealed that disruption of GORK activity resulted in impaired stomatal closure in response to darkness or the stress hormone azobenzene-earsonate. Transpiration measurements on excised rosettes and intact plants (grown in hydroponic conditions or submitted to water stress) revealed that absence of GORK activity resulted in increased water consumption. The whole set of data indicates that GORK is likely to play a crucial role in adaptation to drought in fluctuating environments.

The epidermis of the aerial organs of terrestrial plants presents a waxy cuticle that prevents water loss and desiccation but impedes diffusion of atmospheric CO<sub>2</sub> toward the inner tissues. Gas exchanges mainly take place through microscopic pores, the stomata. Two highly differentiated epidermal cells surrounding the pore, named guard cells, control stomatal aperture, allowing the plant to cope, under diverse environmental conditions, with the conflicting needs of maintaining a sufficient internal CO<sub>2</sub> concentration for photosynthesis and of preventing excessive transpirational water loss (1, 2).

Regulation of stomatal aperture relies on turgor changes of the two guard cells; an increase in turgor, caused by increased solute accumulation, promotes pore opening, whereas a decrease in turgor, caused by solute efflux, leads to stomatal closure (1, 2). The available information indicates that the main solutes involved in the osmoregulation process are sucrose, K<sup>+</sup>, and accompanying anions (malate and chloride), depending on the environmental conditions. In the normal diurnal cycle, stomatal opening in the morning would mainly result from K<sup>+</sup> salt accumulation. In the afternoon, it would mainly rely on sucrose accumulation (3, 4).

The changes in guard cell K<sup>+</sup> contents contributing to stomatal opening/closure have been shown to involve various channels working in a coordinated way in the plasma membrane and tonoplast. Two types of K<sup>+</sup>-permeable voltage-gated channels, either inwardly or outwardly rectifying, have been extensively characterized in the plasma membrane. The inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels activate on membrane hyperpolarization and are therefore mainly involved in K<sup>+</sup> entry into the cell. The outwardly rectifying channels activate on membrane depolarization, at membrane potentials more positive than the K<sup>+</sup>-equilibrium potential, and thus allow K<sup>+</sup> release (5, 6). Molecular and electrophysiological analyses support the hypothesis that these channels are encoded by genes of the *Shaker* family. This family comprises nine members in *Arabidopsis* (7). Three of them, *KAT1* and *KAT2*, which encode inwardly rectifying channels, and *GORK*, which encodes an outwardly rectifying channel, display high expression levels in guard cells as suggested by *GUS* reporter gene approaches (8) and/or quantitative RT-PCR analyses (9, 10). Reverse genetics approaches have been developed to investigate the role of *KAT1* in stomatal opening, using an *Arabidopsis* mutant carrying a knockout mutation in this gene (10) or transgenic *Arabidopsis* lines expressing dominant negative *KAT1* polypeptides (11). The knockout mutation and the expression of dominant negative polypeptides affected inward K<sup>+</sup> channel activity in the guard cell membrane but did not result in total suppression of the inward K<sup>+</sup> current, probably because of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel redundancy. Although the plants expressing dominant negative mutant *KAT1* polypeptides displayed reduced light-induced stomatal opening (11), the relative contribution of the different guard cell inward K<sup>+</sup> channels in stomatal movements remains unclear.

In the present study, we provide evidence that the *Arabidopsis* *GORK* gene encodes the major voltage-gated outwardly rectifying K<sup>+</sup> channel of the guard cell membrane. We also demonstrate that *GORK* plays a role in the control of stomatal movements and allows the plant to significantly reduce transpirational water loss.

## Materials and Methods

**Isolation of the T-DNA-Tagged Mutant *gork-1* Disrupted in the *GORK* Gene.** The *gork-1* knockout line was obtained by PCR screening of ≈40,000 *Arabidopsis thaliana* T-DNA insertion mutants (Was-

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

See commentary on page 4976.

\*Present address: Universität Postdam, Institut für Biochemie und Biologie, Department of Molekularbiologie, D-14476 Golm, Germany.

||To whom correspondence should be addressed. E-mail: sentenac@ensam.inra.fr.

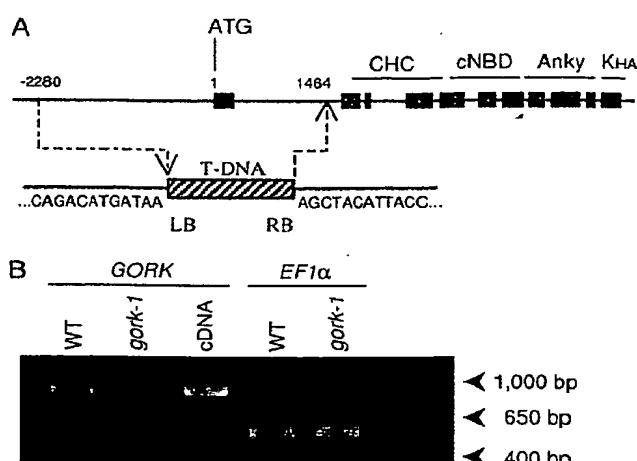
silevskija ecotype; library constructed by the Station de Génétique et Amélioration des Plantes, Versailles, France; ref. 12), with primers corresponding to the *GORK* gene and to the T-DNA left and right borders. Selection on kanamycin revealed a single insertion locus. The exact position of the T-DNA insertion was determined by sequencing the T-DNA flanking sequences. Plants homozygous for the disruption were selected by PCR in the *F*<sub>3</sub> progeny of the positive line.

**Obtention of the *gork-dn* Dominant Negative Transgenic Lines.** The sequence encoding the hallmark GlyTyrGlyAsp motif in the *GORK* pore domain (typical of K<sup>+</sup>-selective channels) was replaced by ArgArgGlyAsp (by site-directed mutagenesis) in the *GORK* gene. The mutated gene, named *gork-dn* (8.78 kb in total, with 2.714 kb upstream from the initiation codon) was cloned into the *Kpn*I-*Sst*I sites of the binary vector pBIB-HYGRO (13). The resulting plasmid was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* GV3010 (pMP90) strain (14). *A. thaliana* (Wassilevskija ecotype) was transformed by using the floral dip method (15). Selection on hygromycin allowed us to identify transformed lines displaying a single insertion locus.

**Intact Plant Transpiration Measurements.** *Arabidopsis* plants were hydroponically grown in a growth chamber (22°C, 65% relative humidity, 8 h/16 h light/dark, 300 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) for 4 weeks before being transferred (a single plant per experiment) to an experimental chamber allowing gas exchange measurements (dew-point hygrometers and infrared gas analyzer) as described (16). The root compartment (500 ml, 21°C) contained an aerated half-strength Hoagland solution. The shoot compartment (23°C, 8 h/16 h light/dark, 400 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>; HQI-TS NDL, Osram, Berlin) was attached to an open-flow gas circuit (air flow: 160 liters/h). At the inlet, the water-vapor pressure was held constant (1.5 kPa) and controlled with a dew-point hygrometer (Hygro, General Eastern Instruments, Woburn, MA). Humidity at the outlet was measured with a second dew-point hygrometer. The water-vapor pressure deficit in the leaf chamber was 0.9 ± 0.1 kPa (leaf and air temperatures measured with thermistors). Transpiration and photosynthesis were monitored for at least 8 days, including a 3-day adaptation period (the data corresponding to the adaptation period were not taken into account in the analyses). Photosynthesis was proportional to the leaf fresh weight and leaf area (data not shown).

**Stomatal Aperture Measurements.** Leaves from 4- to 6-week-old *Arabidopsis* plants were excised at the end of the night period, and epidermal strips were prepared as described (17). After peeling, epidermal strips were placed in Petri dishes containing 5 ml of the incubation solution (usual buffer unless otherwise noted: 30 mM KCl/10 mM Mes-iminodiacetic acid, pH 6.5). To standardize the initial state, epidermal strips were kept in the incubation solution for 30 min in darkness. Then, they were submitted to different treatments at 20°C in darkness or light (300 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>). Stomatal apertures were measured (pore width; at least 60 measurements per experiment in <5 min) with an optical microscope (Optiphot, Nikon) fitted with a camera lucida and a digitizing table (Houston Instruments) linked to a personal computer. Each experiment was performed at least in triplicate.

**Electrophysiological Recordings.** Plants were grown for ≈5 weeks in compost (individual containers) in a growth chamber (21°C, 70% relative humidity, 8 h/16 h light/dark, 300 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>). Guard cell protoplasts were isolated by digestion of leaf epidermal peels. The digestion solution contained 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM ascorbic acid, Onozuka RS cellulase (1% wt/vol, Yakult Pharmaceutical, Tokyo), Y-23 pectolyase (0.1% wt/vol, Seishin Pharmaceutical, Tokyo), and 1 mM Mes-KOH (pH 5.5). The osmo-



**Fig. 1.** Identification of a T-DNA insertion mutant. (A) Schematic diagram of the *GORK* gene indicating the site of insertion of the disrupting T-DNA in the *gork-1* mutant line. Black boxes represent exons. Typical domains of plant Shaker channels (30) are indicated as follows: CHC, channel hydrophobic core; cNBD, putative cyclic-nucleotide binding domain; Anky, ankyrin domain; KHA, KHA domain. The hatched box represents T-DNA. The nucleotide sequence flanking the T-DNA left (LB) and right (RB) borders in the disrupted gene are given. The T-DNA insertion resulted in a 3.7-kb deletion in the 5' region of the gene, from nucleotide -2,280 (upstream from the initiation codon) to nucleotide 1,464 (downstream from this codon). (B) Absence of *GORK* transcripts in the *gork-1* mutant. RT-PCR analyses were performed on total RNA extracted from aerial parts of either wild-type or *gork-1* plants (WT and *gork-1* lanes) by using primers (sequences available on request) specific for *GORK* or for the *Arabidopsis* *EF1α* elongation factor gene (used as a control). The cDNA lane shows PCR-amplified DNA fragment using the same *GORK* primers on the *GORK* cDNA (control).

larity was adjusted to 420 mosM with D-mannitol. The epidermal peels were digested for 40 min at 27°C. Filtration through 50-μm mesh allowed recovery of protoplasts. The filtrate was mixed with three volumes of conservation buffer (10 mM potassium glutamate/1 mM CaCl<sub>2</sub>/2 mM MgCl<sub>2</sub>/10 mM Mes-HCl, pH 5.5, with osmolarity adjusted to 500 mosM with D-mannitol). The protoplast suspension (~10% of guard cell protoplasts, based on microscopic observations) was kept on ice. Patch-clamp pipettes were pulled (P97, Sutter Instruments, Novato, CA) from borosilicate capillaries (Kimax-51, Kimble, Toledo, OH) and fire polished (L/M CPZ 101, List Medical, Darmstadt, Germany). The pipette solution contained 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM potassium glutamate, 2 mM MgATP, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, with osmolarity adjusted to 520 mosM with D-mannitol. The bath solution contained 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM potassium glutamate, 10 mM Mes-HCl, pH 5.5, with osmolarity adjusted to 500 mosM with mannitol. In these conditions, the pipette resistance was ≈10 MΩ. Seals with resistance >5 GΩ were used for electrophysiological analyses. Whole-cell recordings were obtained by using an Axon Instruments Axopatch 200A amplifier. PCLAMP 6.0.3 software (Axon Instruments, Foster City, CA) was used for voltage pulse stimulation, online data acquisition, and data analysis. The voltage protocol consisted in stepping the membrane potential to voltages from -200 to +80 mV in 20-mV increments from a holding potential of -60 mV.

## Results

**Obtention of *Arabidopsis* Mutants Affected in *GORK* Activity.** An *Arabidopsis* mutant line, named *gork-1*, was identified by PCR screening of a collection of T-DNA-transformed plants (Fig. L4; T-DNA insertion flanking sequences indicated in the figure).

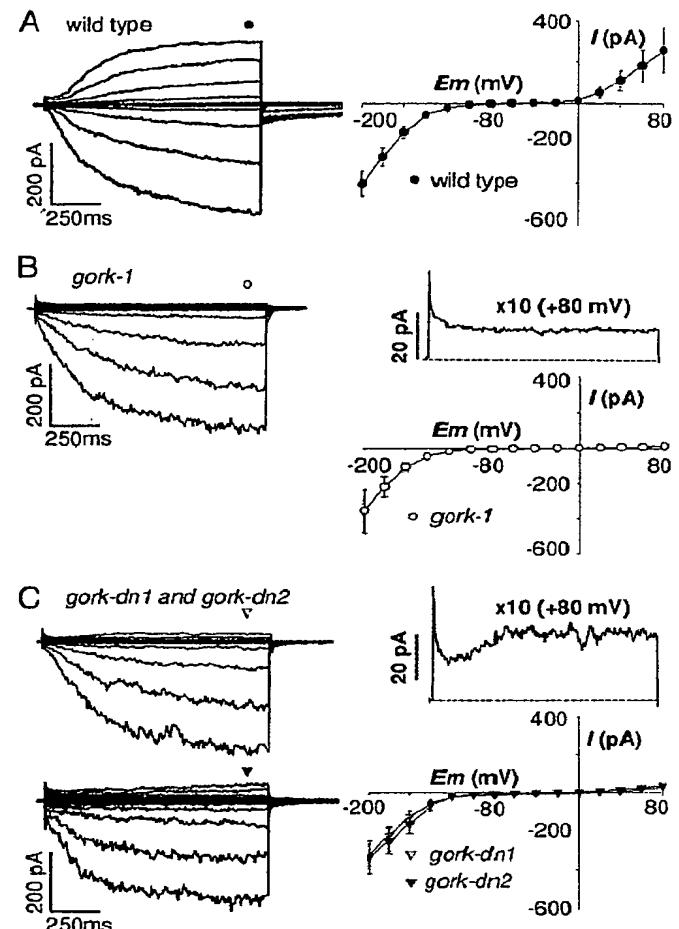
Growth tests on selection medium revealed a single insertion locus (data not shown). The T-DNA insertion was shown to result in a 3.7-kb deletion in the 5' region of the gene (Fig. 1). RT-PCR experiments performed on total RNA extracted from aerial parts of 4-week-old plants grown in a greenhouse indicated that *GORK* transcripts were not accumulated in homozygous *gork-1* plants (Fig. 1B).

Shaker channels are tetrameric proteins (18–20). This structural feature allows us to develop reverse genetics approaches by using dominant negative mutant subunits (obtained by site-directed mutagenesis) able to coassemble with wild-type subunits and to lead to formation of nonfunctional channels (11, 21). Mutations were introduced in the *GORK* coding sequence to replace the hallmark motif GlyTyrGlyAsp, expected to play a crucial role in the formation of the channel-conducting pathway (22), by ArgArgGlyAsp. Experiments in *Xenopus* oocytes revealed that the polypeptide encoded by the mutated sequence was electrically silent (not shown) and indeed endowed with dominant negative behavior; for instance, coinjection of mutant cRNA with wild-type cRNA (*in vitro* transcription) with a mutant/wild-type stoichiometry of 1:1 resulted in  $82 \pm 6\%$  ( $n = 10$ ) inhibition of the GORK current. The corresponding mutation was introduced in the *GORK* gene (8.7 kb in total, with a 2.7-kb promoter region), and the mutated gene was introduced into *Arabidopsis* plants. Single locus transformed lines (checked on hygromycin selection medium) were obtained. Patch-clamp experiments were performed on homozygous transgenic plants from the progeny ( $F_4$  generation) of two of them, named *gork-dn1* and *gork-dn2* in this article.

Homozygous *gork-1*, *gork-dn1*, or *gork-dn2* plants were grown in a greenhouse or growth chamber ( $20^\circ\text{C}$ , 50% relative humidity, 8 h/16 h light/dark,  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Comparison with control wild-type plants grown in parallel in these conditions did not reveal any obvious phenotype. Because previous RT-PCR experiments had shown that *GORK* transcripts are also present in root hairs (23), root systems from plants grown *in vitro* on agar plates were examined under microscope. No obvious effect of the *gork-1* mutation on root hair density or development could be detected (data not shown).

**The *gork-1* Mutation Prevents Expression of the Major Voltage-Gated Outwardly Rectifying K<sup>+</sup> Channel of the Guard Cell.** Patch-clamp experiments on guard cell protoplasts prepared from wild-type plants revealed both inward and outward currents (Fig. 2A), in agreement with previous analyses (6). The outward current was dominated by a slowly activating sigmoidal component, appearing beyond a threshold potential of  $\approx 0$  mV (with  $100 \text{ mM K}^+$  in both the bath and pipette solutions) and strongly reminiscent of that recorded in *Xenopus* oocytes expressing *GORK* cRNA (10). Similar experiments were performed on guard cell protoplasts prepared from homozygous *gork-1* plants (Fig. 2B) or from *gork-dn1* or *gork-dn2* plants (Fig. 2C). They revealed inward K<sup>+</sup> currents quite similar to those recorded in wild-type protoplasts but strongly reduced outward currents. The time course of the remaining outward K<sup>+</sup> current observed in *gork-dn1* (see the current trace at +80 mV magnified  $\times 10$  in Fig. 2C) and *gork-dn2* (data not shown) protoplasts suggested some residual GORK activity. No GORK activity could be detected in *gork-1* guard cells, as shown by the flat kinetics of the residual outward current (current trace at +80 mV magnified  $\times 10$  in Fig. 2B). It can therefore be concluded that *gork-1* is actually a knockout mutation.

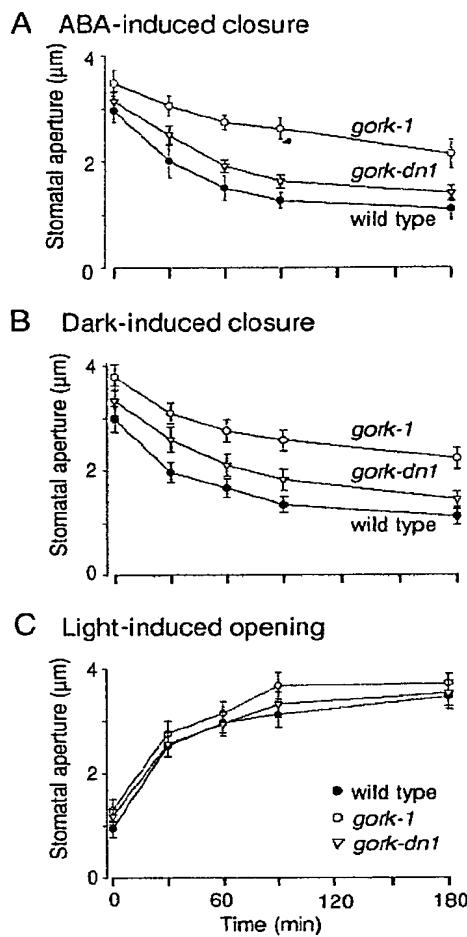
**Bioassays on Epidermal Peels Indicate That Disruption of GORK Activity Affects Stomatal Functioning.** The role of *GORK* in stomatal movements was investigated *in vitro* by submitting epidermal peels from wild-type, *gork-1*, or *gork-dn1* plants to treatments inducing either stomatal closure (azobenzene-earsonate or darkness; Fig. 3A and B, respectively) or opening (light; Fig. 3C).



**Fig. 2.** *GORK* encodes the major voltage-gated outwardly rectifying K<sup>+</sup> channel of the guard cell membrane. Patch-clamp experiments were performed on guard cell protoplasts prepared from wild-type plants (A), homozygous *gork-1* mutant plants (B), or homozygous *gork-dn1* or *gork-dn2* plants, which both express a GORK dominant negative mutant polypeptide (C). (A–C Left) Typical examples of inward and outward currents recorded in whole protoplasts. The current traces obtained at +80 mV in the *gork-1* and the *gork-dn1* protoplasts are shown at  $\times 10$  scale for easier visualization of kinetics in B and C Right (dotted line, zero current level). Current–voltage relationships at steady state (means  $\pm$  SE;  $n = 9$  for wild type, 8 for *gork-1*, 5 for *gork-dn1*, and 5 for *gork-dn2*) are shown (Right). The bath and pipette solutions contained  $100 \text{ mM}$  potassium glutamate. The voltage steps ranged between  $-200$  and  $+80$  mV in 20-mV increments from a holding potential of  $-60$  mV.

Stomatal closure was strongly altered in the *gork-1* and, to a lesser extent, in the *gork-dn1* plants (Fig. 3A and B), indicating that GORK activity was required for efficient stomatal closure. On the other hand, the *gork-1* mutation weakly increased light-induced stomatal opening (Fig. 3C). It is worth noting, however, that *gork-1* peels consistently displayed slightly larger apertures, e.g., by 10–15% at the end of the 3-h light pretreatment in Fig. 3A and B ( $t = 0$ ).

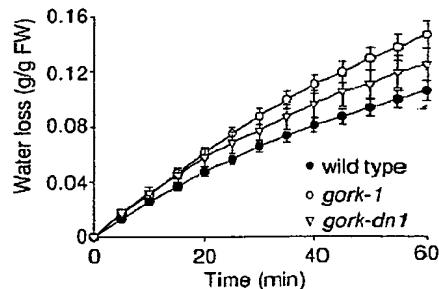
**Excised Rosettes from *gork-1* Plants Display Increased Transpirational Water Loss.** As a first step in investigating the role of *GORK* in the control of leaf transpiration, we measured water loss (decrease in weight) of rosettes excised from wild-type, *gork-1*, or *gork-dn1* plants. The *gork-1* rosettes displayed greater water loss than the wild-type ones, by  $\approx 35\%$  during the first hour after the excision (Fig. 4). The *gork-dn1* rosettes displayed an intermediate phe-



**Fig. 3.** Disruption of GORK activity affects stomatal movements. Epidermal strips were peeled from wild-type (●), homozygous *gork-1* (○), or *gork-dn1* (▽) plants at the end of dark period and transferred to 30 mM KCl and 10 mM Mes-KOH (pH 6.5). (A and B) Epidermal strips were placed under light for 3 h (stomatal opening pretreatment) before stomatal closure was induced ( $t = 0$ ) by adding 20  $\mu$ M azobenzeneearsonate in the bath solution (A) or switching the light off (B). (C) Epidermal peels were kept in darkness for 3 h. Then, the light was switched on to induce stomatal opening. Measurements of stomatal apertures were performed at various times on the same strips during 3 h. Means  $\pm$  SE from four independent experiments, 60 measurements per experiment, are shown.

notype. This provided the first experimental evidence that GORK activity participates in leaf transpiration control.

**Intact Plant Transpirational Water Loss Is Increased by the *gork-1* Mutation.** In a second set of experiments, the effect of the *gork-1* mutation on intact plant transpiration was investigated by using an experimental setup that allowed us to control the water-vapor pressure deficit (0.9 kPa) and to continuously record the plant transpiration and CO<sub>2</sub> fixation rates (open-flow gas circuit). Switching light on and off induced an increase and decrease, respectively, in transpiration rate, leading to a new steady state (Fig. 5A). Analysis of the steady-state data (Fig. 5B) revealed that the *gork-1* plants displayed higher transpiration rates than the wild-type controls, by  $\approx$ 25% in darkness and  $\approx$ 7% in light (the latter difference, however, being not statistically significant). The kinetics of the transitions between the successive steady states were fitted (least-squares adjustment) with first



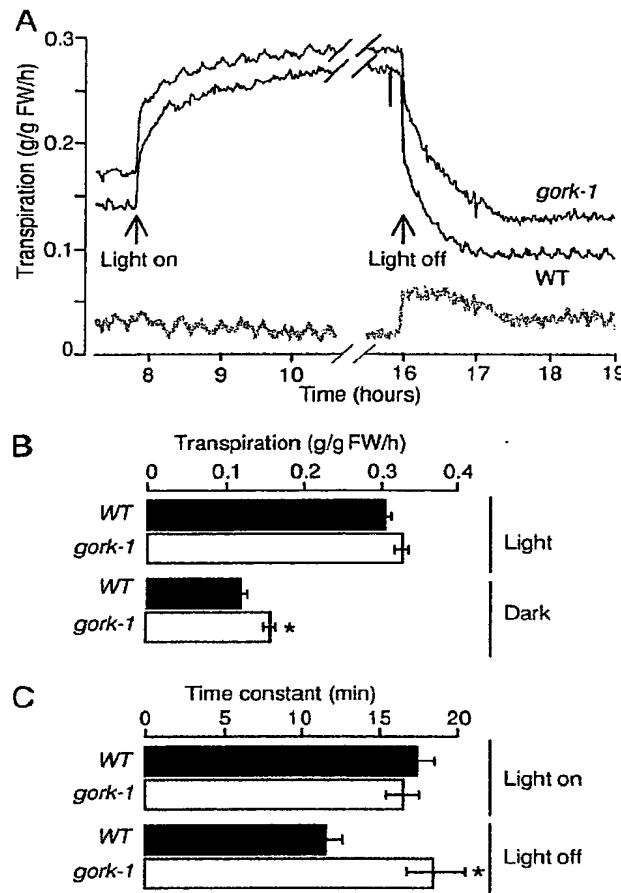
**Fig. 4.** Disruption of GORK activity results in increased water loss from excised rosettes. Rosettes from wild-type (●), *gork-1* (○), and *gork-dn1* (▽) plants grown on compost in growth chamber (21°C, 70% relative humidity, 8 h/16 h light/dark, 300  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) were excised just before the end of the light period and transferred to darkness. Water loss was determined by monitoring the decrease in fresh weight of the excised rosettes. Means  $\pm$  SE of six independent measurements are shown. The difference in transpiration between the wild-type and *gork-1* genotypes is statistically significant (paired values, Student's *t* test  $P \ll 0.01$ ).

order exponential functions to derive the time constants,  $\tau$  (Fig. 5C), assumed to reflect the rate of stomatal movements. The *gork-1* mutation was without any significant effect on the rate of stomatal opening but resulted in a strong decrease in the rate of stomatal closure, the mean  $\tau$  value being shifted from  $\approx$ 12 to 19 min. The former value is consistent with previous analyses of dark-induced stomatal closing in *Arabidopsis* (24) and of dark-induced Rb<sup>+</sup> efflux kinetics in *Commelinaceae* (25).

In another experiment, 6-week-old wild-type and *gork-1* plants grown on compost were submitted to a progressive drought stress over 7 days, leading to loss of leaf turgor. The *gork-1* plants displayed higher transpirational water loss (weight loss) than the wild-type plants, during both the night and the light periods (Fig. 6). The relative difference was clearly more important at the end than at the beginning of the stress treatment ( $\approx$ 30–50% and 5–15%, respectively), suggesting that the relative contribution of GORK to transpiration control is more important in conditions of water shortage.

## Discussion

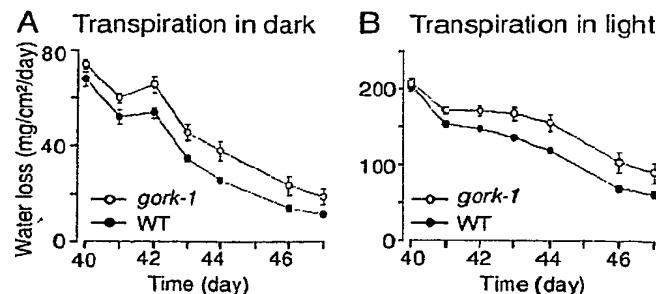
**GORK Encodes the Major Outwardly Rectifying K<sup>+</sup> Channel Active in the Guard Cell Membrane.** *In planta* (electro)physiological analyses have led to the conclusion that K<sup>+</sup> release from the guard cell, leading to stomatal closure, involves the activity of K<sup>+</sup>-selective slowly activating voltage-gated outwardly rectifying channels (6, 26). The functional features of these channels characterized *in vivo* in guard cells of *Arabidopsis* and of a number of other species are very similar to those displayed by the *Arabidopsis* SKOR and GORK channels expressed in heterologous systems (10, 27). These two channels belong to the so-called Shaker family, which comprises nine members in *Arabidopsis* (7). SKOR is expressed in root stellar tissues, where it plays a role in K<sup>+</sup> secretion into the xylem sap (27). RT-PCR experiments have revealed GORK transcripts in guard cells and in root hairs (9, 23). This information supported the hypothesis that the outward K<sup>+</sup> channel active in guard cells was encoded by the GORK gene (in *Arabidopsis*; ref. 10). Here, we show that expressing a dominant negative mutant allele of the GORK gene in *Arabidopsis* leads to a strong decrease in the outward K<sup>+</sup> conductance of the guard cell membrane and that disruption of the GORK gene results in full suppression of this conductance (Fig. 2). Thus, the present data demonstrate that GORK and SKOR are not redundantly expressed in guard cells and that functional expression of the GORK gene is required for voltage-gated outwardly rectifying K<sup>+</sup> channel activity in the guard cell plasma membrane. The



**Fig. 5.** Effect of the *gork-1* mutation on intact plant transpiration in hydroponic conditions. (A) Typical examples of transpiration recordings. A single hydroponically grown wild-type or *gork-1* plant was present in the experimental chamber. The gray curve shows the difference in transpiration between the two plants. (B) Transpiration rates measured as described in A at the end of the light and dark periods (means  $\pm$  SE, four plants per genotype, five successive photoperiods taken into account for each plant). (C) Time constants describing the changes in transpiration rates induced by light or darkness. To derive time constants reflecting the rate of stomatal opening and closure, experimental kinetics (as those shown in A) describing the changes in transpiration rates observed when light was switched on or off were fitted by exponential equations (dashed lines; least-squares fitting, Levenberg–Marquardt algorithm), respectively (means  $\pm$  SE, four plants, five photoperiods per plant). Asterisks indicate that the corresponding differences in dark-induced stomatal closure (lower bars in B and C) are statistically significant (Student's *t* test,  $P < 0.01$ ).

simplest hypothesis is that a single gene, *GORK*, encodes the major voltage-gated outwardly rectifying  $K^+$  channel characterized in this membrane (6).

**GORK Activity Is Involved in the Control of Stomatal Movements.** Circumstantial evidence supported the hypothesis that, by mediating  $K^+$  release, the outward rectifier of the guard cell membrane could play a major role in stomatal closure and thereby in transpiration control. The reverse genetics approach developed in our study provides direct support to this hypothesis. The whole set of data indicates that transpiration is more important in *gork-1* than in wild-type plants, from 10% (Fig. 5) up to  $\approx 50\%$  (Fig. 6), depending on the environmental conditions (water availability in these experiments). Thus, whereas disrup-



**Fig. 6.** Increased contribution of GORK to water saving during water stress. Wild-type or *gork-1* plants were grown in parallel for 6 weeks on compost in a growth chamber ( $20^\circ\text{C}$ , 50% relative humidity, 8 h/16 h light/dark,  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). The experimental procedure ensured that water loss (decrease in weight) resulted from leaf transpiration (mean total leaf area of  $\sim 90 \text{ cm}^2$  per plant at this stage). Periodic weighing and watering allowed us to maintain the water content of the compost at  $\sim 70\%$  (wt/wt) during this period. Then, watering of the plants was stopped ( $t = 0$ ; beginning of the water stress period). Only small amounts of water were daily added to the *gork-1* plant containers, after weighing the devices, to strictly compensate for the difference in transpiration rates between the two genotypes. The compost water content of every container decreased in a similar (and almost linear) way, whatever the plant genotype. The devices were weighed twice a day, at the end of the dark and light periods. The transpirational water loss (mean  $\pm$  SE;  $n = 9$  for the wild-type genotype and 7 for the *gork-1* genotype) during the dark (A) and light (B) periods was expressed on a leaf area basis, the plants being photographed daily (leaf area determined by using OPTIMAS 6.1 software). Plants conspicuously began to suffer from water stress (loss of leaf turgor) 4 days after watering was stopped. The differences between the two genotypes in A and B are statistically significant (paired values, Student's *t* test,  $P \ll 0.01$ ).

tion of the guard cell inward  $K^+$  channel gene *KAT1* has been found to be without any effect on the regulation of stomatal aperture (9), that of the outward channel GORK results in both impaired stomatal movements and impaired transpiration control. This difference is likely to result from the fact that expression of inward  $K^+$  channel activity in guard cells would involve at least two different genes, *KAT1* and *KAT2* (8), whereas the outwardly rectifying  $K^+$  channel activity relies mainly on a single gene, *GORK*.

*In vitro* analyses using epidermal peels are likely to give a distorted view of *in planta* stomatal control because of the lack of functional interactions with the surrounding epidermal cells. The bioassays shown in Fig. 3 would suggest larger differences in transpiration between wild-type and *gork-1* plants than those observed in Fig. 5. However, this discrepancy could result, at least in part, from the fact that hydroponic conditions (Fig. 5) lessen the importance of stomata, and thus of GORK activity, in the control of transpiration. Indeed, larger differences in transpirational water loss between the wild-type and *gork-1* genotypes were observed when the plants were grown in compost and submitted to water shortage (Fig. 6).

Larger steady-state stomatal apertures were found in *gork-1* than in wild-type epidermal peels not only at the end of closure-inducing treatments (azobenzene-arsenate, darkness; Fig. 3A and B) but also at the end of 3-h light-induced opening pretreatments/treatments (experimental points corresponding to time 0 in Fig. 3). Consistent with these observations, *in planta* analyses revealed that *gork-1* plants displayed higher transpiration rates than wild-type plants not only in darkness but also in light (Figs. 5 and 6). These results suggest that GORK could act as a negative regulator of stomatal opening in light, in addition to playing a role in stomatal closure. It has been shown that the membrane voltage in guard cells can undergo large ( $>100 \text{ mV}$ ) and rapid ( $\approx 10\text{-s}$  period) oscillations between hyperpolarized

values allowing K<sup>+</sup> uptake and depolarized values allowing K<sup>+</sup> release (28). This has led to the hypothesis that control of stomatal movements and steady-state aperture depends on variations in the pattern of these oscillations, enabling the net guard cell K<sup>+</sup> content to increase or to decrease as a result of changes in the balance of K<sup>+</sup> uptake through hyperpolarization-activated channels and K<sup>+</sup> release through depolarization-activated channels (28). The proposal that GORK might act as a negative regulator of stomatal opening stands coherently within the framework of this hypothesis.

**Physiological Significance and Role in Natural Conditions.** The available information indicates that the dominant solutes involved in guard cell osmoregulation and control of stomatal aperture are K<sup>+</sup> salts and sugars (mainly sucrose), depending on the environmental conditions and the time of the day (4, 29). Genetic tools allowing the assessment of the relative contribution of these solutes and of the mechanisms responsible for their transport and accumulation are highly needed. The present data provide direct genetic evidence that *GORK* encodes the major voltage-gated outwardly rectifying K<sup>+</sup> channel expressed in the guard cell plasma membrane, its disruption resulting in a dramatic decrease in the membrane outward K<sup>+</sup> conductance. However, when grown in standard controlled conditions or even in the greenhouse, *gork-1* plants do not display any obvious phenotype. Furthermore, the *gork-1* stomata can undergo large movements (Fig. 3). This indicates that, in the absence of the GORK channel, different processes, likely to involve activity of other K<sup>+</sup> efflux systems, can efficiently contribute to the decrease in turgor pressure leading to stomatal closure. Based on the present data, it cannot be said whether these processes/systems significantly contribute to stomatal closure also in the presence of GORK activity or whether they correspond to compensation

mechanisms resulting from the loss of GORK activity. It is worthy to note that the very low level of GORK current remaining in the plants expressing the dominant negative mutant channel resulted in a stomatal phenotype closer to that of the wild-type plants than to that of the *gork-1* plants (Fig. 3). The dominant negative mutant lines could be valuable genetic tools to further investigate why stomatal physiology requires the guard cell membrane to be fitted with a large voltage-gated outwardly rectifying K<sup>+</sup> conductance.

In hydroponic conditions, the absence of GORK activity resulted in an increase in steady-state transpiration, by ≈7% in light and 25% in darkness (Fig. 5B). During the light-to-dark transition, the increase in water loss reached higher percentages (up to 40–50%; see the peak displayed by the gray curve in Fig. 5A) because of the slower closure kinetics during the transition from the open to the closed steady state once light was turned off. Thus, the contribution of GORK to water saving would be more important in natural conditions with fluctuating environmental conditions requiring rapid adaptation of stomatal opening (e.g., sudden changes in water-vapor pressure deficit and/or light intensity). Also, the data shown in Fig. 6 highlight that drought conditions amplify the relative contribution of GORK to water saving. Reduced water consumption by ≈10–20% can allow the plant to postpone dehydration by several days. Thus, the *GORK* gene is likely to play an important role in drought adaptation and to be under high selection pressure in natural fluctuating environments.

We are grateful to I. A. Lefevre and S. Zimmermann for helpful discussions and comments on the manuscript. This work was partly supported by a Marie Curie Fellowship of the European Union (to I.D.) and an Indo-French Center for the Promotion of Advanced Research grant (to A.V.).

1. Assmann, S. M. (1993) *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 345–375.
2. MacRobbie, E. A. C. (1981) *J. Exp. Bot.* **32**, 563–572.
3. Talbott, L. D. & Zeiger, E. (1993) *Plant Physiol.* **102**, 1163–1169.
4. Tallman, G. & Zeiger, E. (1988) *Plant Physiol.* **88**, 887–895.
5. Schroeder, J. I., Raschke, K. & Neher, E. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4108–4112.
6. Roelfsema, M. R. G. & Prins, H. B. A. (1997) *Planta* **202**, 18–27.
7. Véry, A.-A. & Sentenac, H. (2002) *Trends Plant Sci.* **7**, 168–175.
8. Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Chérel, I., Boucherez, J., Thibaud, J. B. & Sentenac, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 3215–3221.
9. Szuroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2917–2921.
10. Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G. & Hedrich, R. (2000) *FEBS Lett.* **486**, 93–98.
11. Kwak, J. M., Murata, Y., Baizabal-Aguirre, V. M., Merrill, J., Wang, M., Kemper, A., Hawke, S. D., Tallman, G. & Schroeder, J. I. (2001) *Plant Physiol.* **127**, 473–485.
12. Bechtold, N., Ellis, J. & Pelletier, G. (1993) *C. R. Acad. Sci.* **316**, 1194–1199.
13. Becker, D. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 203.
14. Koncz, C. & Schell, J. (1996) *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383–396.
15. Clough, S. J. & Bent, A. F. (1998) *Plant J.* **16**, 735–743.
16. Vavasseur, A., Lascèvre, G. & Couchat, P. (1988) *Physiol. Plant* **73**, 547–552.
17. Leonhardt, N., Marin, E., Vavasseur, A. & Forestier, C. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14156–14161.
18. Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Müller-Röber, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, G. & Hedrich, R. (1997) *Biophys. J.* **72**, 2143–2150.
19. Daram, P., Urbach, S., Gaymard, F., Sentenac, H. & Chérel, I. (1997) *EMBO J.* **16**, 3455–3463.
20. Urbach, S., Chérel, I., Sentenac, H. & Gaymard, F. (2000) *Plant J.* **23**, 527–538.
21. Baizabal-Aguirre, V. M., Clemens, S., Uozumi, N. & Schroeder, J. I. (1999) *J. Membr. Biol.* **167**, 119–125.
22. Nakamura, R. L., Anderson, J. A. & Gaber, R. F. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1011–1018.
23. Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H. H. & Hedrich, R. (2001) *FEBS Lett.* **508**, 463–469.
24. Felle, H. H., Hanstein, S., Steinmeyer, R. & Hedrich, R. (2000) *Plant J.* **24**, 297–304.
25. MacRobbie, E. A. C. (1983) *J. Exp. Bot.* **34**, 1695–1710.
26. Thiel, G. & Wolf, A. H. (1997) *Trends Plant Sci.* **2**, 339–345.
27. Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J. B. & Sentenac, H. (1998) *Cell* **94**, 647–655.
28. Gradmann, D. & Hoffstadt, J. (1998) *J. Membr. Biol.* **166**, 51–59.
29. Talbott, L. D. & Zeiger, E. (1998) *J. Exp. Bot.* **49**, 329–337.
30. Zimmermann, S. & Sentenac, H. (1999) *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 477–482.

**PLANT BIOLOGY.** For the article “The *Arabidopsis* outward K<sup>+</sup> channel *GORK* is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration,” by Eric Hosy, Alain Vavasseur, Karine Mouline, Ingo Dreyer, Frédéric Gaymard, Fabien Porée, Jossia Boucherez, Anne Lebaudy, David Bouchez, Anne-Aliénor Véry, Thierry Simonneau, Jean-Baptiste Thibaud, and Hervé Sentenac, which appeared in issue 9, April 29, 2003, of *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (100, 5549–5554; First Published April 1, 2003; 10.1073/pnas.0733970100), the authors note that the word “azobenzeneарsonate” should have read “abscisic acid” throughout the article. This error occurred in line 20 of the abstract; on page 5551, left column, second line from the bottom; on line 6 of the Fig. 3 legend; and on page 5553, right column, 11 lines from the bottom. The conclusions presented are unaffected by this change.

[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1332514100](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1332514100)

### **III.2.- Mise au point d'un système hétérologue végétal permettant la caractérisation de canaux ioniques**

#### **III.2.1.. Présentation de l'article 2**

##### ***Utilité des systèmes d'expression hétérologue***

Les systèmes de transport ionique présents sur les membranes cellulaires confèrent à celles-ci une conductance électrique c'est à dire une capacité à laisser passer un courant électrique lorsque la différence de potentiel transmembranaire le permet. Les différentes techniques de "voltage-clamp" permettent d'étudier la conductance électrique membranaire (le principe du "voltage-clamp" consiste à imposer une différence de potentiel à la membrane -ou à un fragment de membrane- et à enregistrer le courant électrique qui circule alors; Hodgkin et al., 1952; Neher and Sakmann, 1976). L'intérêt de ces techniques pour le biologiste est qu'elles donnent des informations sur les propriétés fonctionnelles des systèmes de transport ionique. Toutefois, dans la plupart des cellules, plusieurs types différents de systèmes de transport ionique contribuent simultanément au courant enregistré sur une cellule entière. Ce courant dit "macroscopique" est parfois difficile, voire impossible, à décomposer.

Il existe cependant des types cellulaires (ovocytes non fécondés, lignées cellulaires embryonnaires de mammifères, etc.) qui n'expriment pas ou peu de systèmes membranaires de transport ionique et dont la conductance membranaire est faible. Différentes méthodes ont été mises au point pour exprimer dans ces contextes "électriquement silencieux" des systèmes de transport ionique hétérologues. De cette manière, il devient théoriquement possible d'étudier les propriétés fonctionnelles d'un canal ionique, à condition d'avoir cloné sa séquence nucléotidique. Du fait que le niveau d'expression du canal est relativement élevé, la conductance correspondante domine généralement la conductance membranaire (cas où certains systèmes endogènes seraient exprimés). L'étude des propriétés fonctionnelles du système d'intérêt est donc théoriquement plus facile que dans son contexte homologue.

##### ***Les cellules mésophylliennes de tabac comme nouveau système d'expression hétérologue?***

Les systèmes d'expression hétérologues les plus utilisés par les électrophysiologistes sont les ovocytes de Xénopé, utilisés pour la première fois pour l'expression d'un transporteur par Sumikawa et ses collaborateurs (1981) et les cellules COS (Mellon et al., 1981; Gu et al., 1990), et HEK (Ukomadu et al., 1992). Il s'agit de cellules animales et il n'est pas toujours possible d'obtenir une expression fonctionnelle de gènes clonés chez une plante (problèmes de stabilité/traduction du transcript, d'adressage ou de modification post-traductionnelle de la protéine, etc.). En effet, si certains canaux végétaux comme KAT1 et SKOR ont pu être étudiés en contexte animal (Nakamura et al., 1995; Gaymard et al., 1998), certains canaux Shaker (AKT6, AtKC1; Dreyer et al., 1997), les CNGCs (canaux censés être activés par les nucléotides cycliques, codés par une famille de 20 gènes chez *Arabidopsis*; Talke et al., 2003) et les canaux anioniques de type CLC (Barbier-Brygoo et

al., 2000) ne génèrent aucune activité électrique exogène dans les contextes hétérologues classiquement utilisés.

Depuis une dizaine d'année, des laboratoires travaillant sur les plantes tentent de mettre au point un système d'expression hétérologue végétale permettant des analyses électrophysiologiques. Pour cela, des cellules de plantes électriquement silencieuses pour certains ions (essentiellement chlorure ou potassium) sont recherchées.

En 1993, l'étude par Van Duijn et ses collaborateurs des conductances potassiques sur des cellules de tabac en suspension révèle la présence de conductances potassiques endogènes sortantes et entrantes pour la majorité des cellules (Van Duijn et al., 1993). Des conductances similaires sont observées sur la membrane des protoplastes de cellules mésophylliennes d'*Arabidopsis*.

En 1998, Bei et Luan constatent que les protoplastes de cellules mésophylliennes de tabac ne possèdent pas de conductances potassiques entrantes, ce qui potentiellement les rend utilisables comme système hétérologue (Bei and Luan, 1998). Afin d'exprimer le canal KAT1 dans ce type cellulaire, ils transforment du tabac de façon stable (inoculation de disque de feuille par la bactérie *Agrobacterium t.* puis régénération de cals; Horsch et al., 1985) afin d'obtenir des plantes transgéniques exprimant constitutivement le gène *KAT1*. L'enregistrement des courants sur les protoplastes de cellules mésophylliennes de tabac transgéniques révèle la présence de courants aux propriétés comparables à celles des courants catalysés par le canal KAT1 dans les systèmes hétérologues animaux. Ce protocole a donc permis pour la première fois, la caractérisation d'un canal végétal dans un système hétérologue végétal. Cependant l'obtention d'agrobactéries recombinantes, la transformation des plantes ainsi que leur régénération limite l'utilisation de ce système.

#### ***Une méthode d'utilisation des protoplastes de mésophylle de tabac pour l'expression hétérologue : localisation subcellulaire et patch-clamp***

Les cellules mésophylliennes de tabac sont un matériel biologique intéressant pour deux raisons majeures : elles ne présentent que de faibles conductances potassiques entrantes endogènes et leur mode de transformation transitoire est déjà bien maîtrisé puisque, depuis près de dix ans, ces cellules sont utilisées en tant que système végétal d'expression transitoire de protéines fusionnées à la GFP afin d'étudier la localisation sub-cellulaire et le mode d'adressage de ces protéines vers les différents compartiments cellulaires (Sheen et al., 1995; Plautz et al., 1996).

En couplant ces avantages nous avons pu mettre au point un nouveau système d'expression transitoire de canaux potassiques dans des protoplastes de cellules mésophylliennes de tabac. Les cellules sont transformées suite à un traitement au PEG par un plasmide contenant à la fois le gène de la GFP permettant de repérer les cellules transformées et l'ADNc codant le canal étudié, les deux gènes étant sous le contrôle de deux promoteurs identiques.

Dans un premier temps, nous avons testé ce système en transformant les cellules de tabac avec le gène codant le canal KAT1 dont les propriétés fonctionnelles sont déjà connues. Toutes les cellules fluorescentes présentaient des courants potassiques identiques à ceux enregistrés auparavant sur les différents systèmes hétérologues animaux exprimant *KAT1*. Ces résultats valident ce système en montrant d'une part que l'expression du gène de la GFP est un bon marqueur des cellules exprimant le gène d'intérêt, et d'autre part que les courants potassiques endogènes entrants sont

suffisamment faibles pour ne pas interférer avec les courants conduits par le canal exprimé. Nous avons ensuite tenté d'exprimer le canal AKT1 qui ne catalyse de courants ni dans les cellules COS ni dans les ovocytes de xénophage. Des courants de forte intensité ont pu être enregistrés sur les membranes des cellules fluorescentes et leurs caractéristiques d'activation et de sélectivité sont identiques à celles des courants AKT1 déjà observés en cellules Sf9 et *in vivo* sur des protoplastes de racines d'*Arabidopsis thaliana* (Gaymard et al., 1996; Reintanz et al., 2002).

Nous proposons donc l'utilisation de cellules mésophylliennes de tabac comme nouveau système d'expression hétérologue de canaux potassiques entrants et éventuellement d'autres systèmes de transport.

## Methodology

## Open Access

### A procedure for localisation and electrophysiological characterisation of ion channels heterologously expressed in a plant context

E Hosy<sup>†1,2</sup>, G Duby<sup>†1,3</sup>, A-A Véry<sup>1</sup>, A Costa<sup>1,4</sup>, H Sentenac<sup>1</sup> and J-B Thibaud \*<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>Biochimie et Physiologie Moléculaires des Plantes, UMR 5004, Agro-M/CNRS/INRA/LIM2, F-34060 Montpellier Cedex 1, France,

<sup>2</sup>Present address: Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, UMR 5090, CEA-DRDC-BMC, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France, <sup>3</sup>Present address: Unité de Biochimie Physiologique, Institut des Sciences de la Vie, Université Catholique Louvain, Place Croix du Sud, 5-15, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium and <sup>4</sup>Present address: Division of Biology, Cell and Developmental Biology Section, and Center for Molecular Genetics, University of California San Diego, CA 92093-0116 La Jolla, USA

Email: E Hosy - ehosy@cea.fr; G Duby - duby@fysa.ucl.ac.be; A-A Véry - very@ensam.inra.fr; A Costa - acosta@ucsd.edu; H Sentenac - sentenac@ensam.inra.fr; J-B Thibaud\* - thibaud@ensam.inra.fr

\* Corresponding author    †Equal contributors

Published: 19 December 2005

Received: 30 September 2005

Plant Methods 2005, 1:14 doi:10.1186/1746-4811-1-14

Accepted: 19 December 2005

This article is available from: <http://www.plantmethods.com/content/1/1/14>

© 2005 Hosy et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Abstract

**Background:** In silico analyses based on sequence similarities with animal channels have identified a large number of plant genes likely to encode ion channels. The attempts made to characterise such putative plant channels at the functional level have most often relied on electrophysiological analyses in classical expression systems, such as *Xenopus* oocytes or mammalian cells. In a number of cases, these expression systems have failed so far to provide functional data and one can speculate that using a plant expression system instead of an animal one might provide a more efficient way towards functional characterisation of plant channels, and a more realistic context to investigate regulation of plant channels.

**Results:** With the aim of developing a plant expression system readily amenable to electrophysiological analyses, we optimised experimental conditions for preparation and transformation of tobacco mesophyll protoplasts and engineered expression plasmids, that were designed to allow subcellular localisation and functional characterisation of ion channels eventually in presence of their putative (possibly over-expressed) regulatory partners. Two inward K<sup>+</sup> channels from the Shaker family were functionally expressed in this system: not only the compliant KAT1 but also the recalcitrant AKT1 channel, which remains electrically silent when expressed in *Xenopus* oocytes or in mammalian cells.

**Conclusion:** The level of endogenous currents in control protoplasts seems compatible with the use of the described experimental procedures for the characterisation of plant ion channels, by studying for instance their subcellular localisation, functional properties, structure-function relationships, interacting partners and regulation, very likely in a more realistic context than the classically used animal systems.

## Background

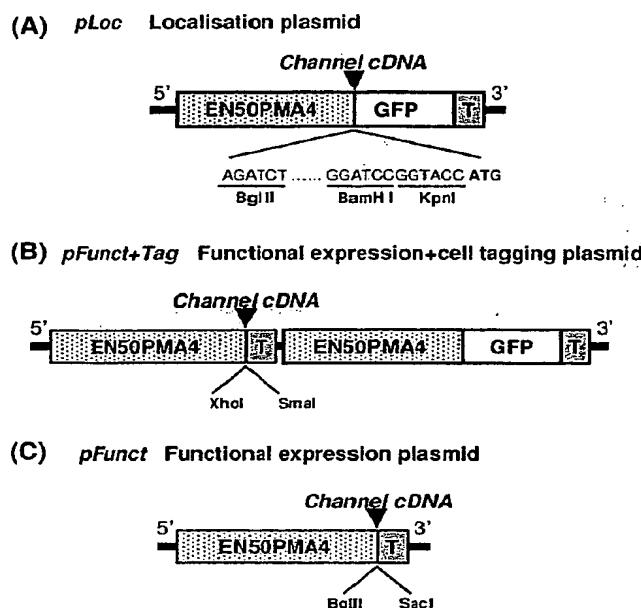
Ion channel activity is essential to living cells in both plants and animals. Classical (or "forward") electrophysiology consists in measuring the cell membrane conductance and in deciphering this complex parameter towards the identification of the underlying ion transport systems and subsequently in getting as much information as possible on their functional properties, pharmacology, regulation and integration in cellular functions. In the late 70's to early 80's, the invention of the patch-clamp technique allowed this to be performed down to the molecular "single channel" level. At about the same time, came another breakthrough: the cloning of genes encoding ion pumps and channels enabled the inception of what could be named "reverse" electrophysiology, *i.e.*, taking a road that leads from the *ex-situ* characterisation of a given ion transport system to its function in the cell or organism. Since the early characterisation of an acetylcholine receptor and a Na<sup>+</sup> channel of electric fish [1,2], this route has increasingly been taken while the knowledge of genomes became available.

In plants, ion channels are acknowledged to play crucial roles in transport of nutrient ions and control of membrane potential, and to be players or final targets of signal transduction pathways [3]. *In planta*, electrophysiological analyses have revealed a wide array of ion channels, differing in their ionic selectivity (anion or cation channels, selective cation channels permeable to either K<sup>+</sup> or Ca<sup>2+</sup>, poorly selective channels, *etc.*), or in their activation mechanism (voltage-gated, stretch-activated, or ligand-gated channels). To date however, the molecular structures mediating many ionic currents described *in vivo* remain to be identified. Only a few plant channels, most of them belonging to the Shaker family [4], have been characterised at the molecular level and correlated with physiological functions. Little is known at the molecular level about non-selective cation channels, Ca<sup>2+</sup> channels, stretch-activated channels or anion channels.

A convenient and realistic heterologous expression system is a prerequisite for successful "reverse" electrophysiology investigations. An ideal system should consist in cells devoid of endogenous ion transport activity ("electrically silent") and widely permissive in terms of foreign gene expression. The most widely used systems, *Xenopus* oocytes [5] or cell lines such as COS, Sf9 or HEK cells [6-10] do not fulfil this key requirement, but they generally offer acceptable compromises. Plant electrophysiologists have however experienced that strategies relying on heterologous expression in animal contexts are often poorly efficient for characterisation of plant ion channels. For example, this has been true for some Shaker-like K<sup>+</sup> channels [11], cation channels from the putative cyclic nucleotide gated channel (CNGC) family [12], glutamate

receptors [13,14] and anion channels (CLCs) [15]. Such difficulties might be due to problems in RNA translatability and protein targeting, or to differences in post-translational modifying processes or in control by interacting protein partners, between the plant native context and the animal heterologous one. Surprisingly, in some cases, after several failures to characterise a given plant channel in different animal expression systems, the use of another animal system can open the way to functional analyses. This has been the case for the *Arabidopsis* Shaker K<sup>+</sup> channel AKT1, which is electrically silent when expressed in *Xenopus* oocytes [11] but gives rise to hyperpolarisation activated inward currents when expressed in insect cells [16]. However, the search for the suitable system will remain quite empirical until the reasons why a given channel is expressed in a functional state or not in a given animal system are discovered.

Bei and Luan opened the way towards a "green" heterologous expression system when they found that tobacco mesophyll protoplasts are devoid of K<sup>+</sup> inward currents and demonstrated that the KAT1 Shaker channel could be heterologously expressed and subsequently characterised therein [17]. The stable transformation protocol by Agrobacterium infiltration of leaf disks and subsequent regeneration of a plant [18], however, is time consuming. Another drawback of this method is that ubiquitous expression of some transgenes may, in some instances, prevent the regeneration of a transformed plant that is required to obtain mesophyll protoplasts, or induce inopportune transcriptome modifications. On the other hand, the transient expression of protein-GFP fusions in tobacco cells has been used since about 8 years to study the targeting of proteins [19,20] suggesting possible use of these cells for electrophysiological characterisation of electrogenic transport systems [21]. Based on this, we developed a new procedure relying on transient transformation of tobacco mesophyll protoplasts. Vectors (available upon request) were engineered that allow selection of the transformed protoplasts (GFP reporter), expression of GFP-tagged or untagged proteins (for subcellular localisation and electrophysiological analyses, respectively), and co-expression of two different proteins in order to investigate their functional interactions. A PEG-mediated transformation protocol was adapted and the potential usefulness of the method was assessed by functional expression of the AKT1 channel, a result that had not been obtained in *Xenopus* oocytes or COS cells as mentioned above. The whole set of data indicates that the method can indeed provide a new way to functional analyses of plant ion channels.



**Figure 1**  
**Expression vectors engineered for transformation of tobacco mesophyll protoplasts.** (A) *pLoc*. This vector carries a single over-expression cassette. The green fluorescent protein cDNA ("GFP") is framed by a strong promoter ("EN50PMA4") and a terminator ("T"). Three restriction sites (Bgl II, BamH I, Kpn I) are available for in-phase cloning of another cDNA. "ATG" indicates the first GFP codon. This vector allows the expression of fusion polypeptides with a GFP-tag in C-terminal for localisation purpose. (B) *pFunct+Tag*. This vector carries two expression cassettes both featuring the EN50PMA4 promoter and the T terminator. The first cassette encodes the GFP alone and the second one displays two restriction sites (Xho I, Sma I) for cDNA cloning. *pFunct+Tag* is used for functional expression of the recombinant cDNA while fluotagging transformed cells. (C) *pFunct*. This vector has the same construction as *pFunct+Tag* but the GFP cassette is absent. It is used, in combination of *pLoc* or *pFunct+Tag*, when two cDNAs are to be co-expressed (see text). EN50PMA4 is a tobacco enhanced promoter (see "Methods"); and T: is the nopaline synthase terminator of *Agrobacterium tumefaciens*. These vectors were obtained in pTZ-19U plasmid (Stratagene, LaJolla, CA, USA) background.

## Results

### Genetic constructions for transient expression in tobacco protoplasts

Expression plasmids were engineered to display the following key features: (i) tagging of transformed cells, (ii) obtaining high expression levels of the studied protein(s), (iii) allowing both subcellular localisation and functional characterisation of the protein(s) of interest.

Selection markers such as antibiotic resistance or GUS staining are not suited to selection of protoplasts intended for patch-clamping. We therefore opted for a GFP-based selection. Indeed, GFP is easily expressed in plant cells with few or no drawbacks, when not fused to another protein. Fusion of GFP to membrane proteins, K<sup>+</sup> channels in our case, can be a solution for both detecting transformed cells and studying tagged-polypeptides [21]. It cannot be excluded, however, that, in some instances, tag-fused polypeptides display altered function and/or impaired multimeric assembly or interaction with regulating factors [22]. Therefore, vectors were constructed to enable either expression of the protein of interest fused to GFP for sub-cellular localisation, or co-expression of this protein and of GFP for functional characterisation purposes, as detailed below.

Four plasmids containing one or two expression cassettes were constructed. Each expression cassette was featured with the EN50PMA promoter and the nopaline synthase terminator of *Agrobacterium tumefaciens* (noted T in Figure 1), a combination previously used for transient expression of mitochondria-targeted GFP in tobacco protoplasts [23]. The EN50PMA promoter consists of the *pma4* (plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoform #4 gene) promoter in which the CaMV 35S enhancer is inserted at position -50 upstream from the transcription start of the *pma4* gene. This promoter has been shown to yield expression levels at least ten fold higher than the classical CaMV 35S promoter [24].

In the first plasmid, called *pLoc*, a short polylinker (made of three restriction sites) was inserted between EN50PMA and the GFP-coding sequence (Figure 1A). This plasmid, expressing a GFP-tagged polypeptide with the polypeptide cDNA (free from STOP codon) cloned at the polylinker in frame with GFP, was used for subcellular localisation.

The second plasmid, called *pFunct+Tag* contained two expression cassettes, separately expressing the cloned polypeptide cDNA and GFP (Figure 1B). It was used for both functional expression of the polypeptide and fluotagging of transformed protoplasts.

The third plasmid, called *pFunct*, contained one single expression cassette allowing expression of the cloned polypeptide without a GFP-tag (Figure 1C). It can be used in co-transformation experiments. In such experiments, this vector, recombining one cDNA, can be co-expressed with either the *pLoc* or *pFunct+Tag* plasmids, recombining another cDNA, thereby allowing the study of interactions between the two encoded polypeptides, regarding their subcellular localisation or functional properties, respectively.

In control experiments, empty *pLoc* vector was used to express GFP alone. This was made for electrophysiological analysis of control protoplasts having undergone the transformation process without expression of a foreign cDNA (except GFP).

**Preparation and transformation of tobacco protoplasts**  
 Tobacco leaf protoplasts have been obtained and subsequently transformed for GFP-enabled localisation purposes since about a decade [25,26]. We experienced, however, that obtaining protoplasts readily amenable to patch-clamp experiments required the digestion, purification and transformation steps to be optimised as described below (see the proposed protocol in "Methods"). The duration of digestion appeared to be critical for the success of patch-clamp experiments. Despite the fact that a high transformation efficiency was obtained on 15-hour digested cells, a 19-hour digestion time resulted in an increased gigaseal success rate, probably because of an improved accessibility of the patch pipette to the cell membrane. A high density solution (MLO6) was added to the final incubation medium (see "Methods") in order to increase the solution density and to separate, after a 7 minute-centrifugation at 110 g, the alive and floating protoplasts from the sedimented dead ones. Performing the digestion and the transformation in the dark and subsequently keeping the protoplasts in the dark at 19 °C until patch-clamping, also facilitated gigaseals probably because darkness and moderate temperature slowed new cell wall synthesis.

The transformation was performed with a PEG-mediated technique. Several polymers of PEG were tested at different concentrations and the best yield of transformation (averaging 20%) was obtained with a 25% (w/v) concentration of PEG-6000. The electroporation transformation technique was also tested but a lot of cells did not withstand the electrical pulse and the yield of transformation was around 5%. Moreover, this technique requires a lot of DNA (30 µg) and cells ( $1.5 \cdot 10^6$  cells/transformation) [27] whereas, in our conditions, the PEG technique requires 5 µg DNA and around  $5 \cdot 10^5$  cells only per transformation [28]. A critical step for transformation is purity of the DNA. In our experiments, Nucleobond® AX affinity columns (Macherey-Nagel, Düren, Germany) were used for DNA purification and a drastic decrease in the efficiency of transformation was observed when old DNA preparations (> 1 month) or DNAs prepared by cell lysis and ethanol precipitation were used.

#### Tobacco mesophyll protoplasts show weak inward K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> currents

The native plasma membrane conductance of tobacco mesophyll protoplasts was investigated to test whether they could be used as hosts to express K<sup>+</sup> (or cationic) or/

and Cl<sup>-</sup> (anionic) channels. The patch-clamp technique was applied to non-transformed and to GFP-tagged (transformed with empty *pLoc* vector) protoplasts. In both cases, similar recordings were obtained revealing that the native membrane conductance was modified neither by the PEG treatment nor by expression of GFP, and that the PEG treatment did not alter the membrane amenability to patch-clamping (not shown).

Two patterns of native inwardly-rectifying K<sup>+</sup> currents could be observed during hyperpolarising pulses. About one third of the cells displayed virtually no inward current (Figure 2C). The other cells displayed low intensity ( $9 \pm 3$  pA·µm<sup>-2</sup> ( $n = 9$ ) at -200 mV) currents, which activated instantaneously upon hyperpolarisation below -140 mV (Figure 2B), and which were insensitive to Cs<sup>+</sup>, a classical K<sup>+</sup> channel blocker (not shown).

Large ( $45 \pm 13$  pA·µm<sup>-2</sup> ( $n = 10$ ) at +100 mV) outwardly-rectifying K<sup>+</sup> currents were activated by depolarising pulses (Figure 2C). These currents were probably due to the activity of Shaker channels as they displayed activation kinetics and extracellular potassium dependence reminiscent of those described for SKOR and GORK *Arabidopsis* outwardly-rectifying Shaker channels [29-31].

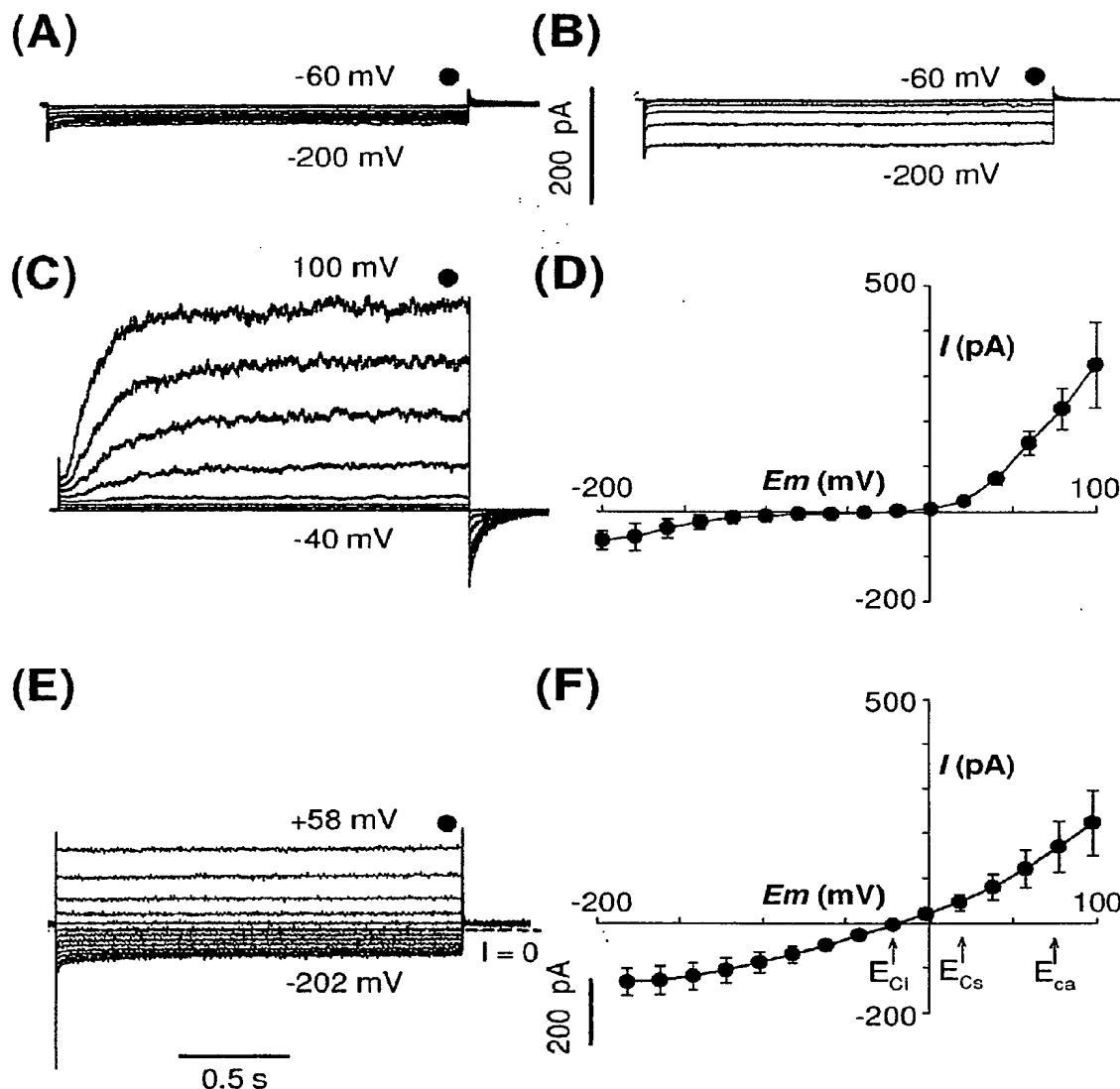
An average current-voltage relationship of control protoplasts (transformed with empty *pLoc* vector) is shown in Figure 2D. The low intensity of the instantaneous inward K<sup>+</sup> current seems compatible with the use of tobacco mesophyll protoplast as an expression system for heterologous inward K<sup>+</sup> channels.

Native anionic currents in these mesophyll protoplasts were recorded when Cl<sup>-</sup> ions were the sole diffusible anions in both bath and pipette solutions (Cs<sup>+</sup> being added to block the K<sup>+</sup> currents). Outward currents were recorded ( $30 \pm 9.6$  pA·µm<sup>-2</sup> ( $n = 10$ ) at +100 mV, Figure 2E-F), indicating that depolarisation-activated anion channels dominated the anionic conductance.

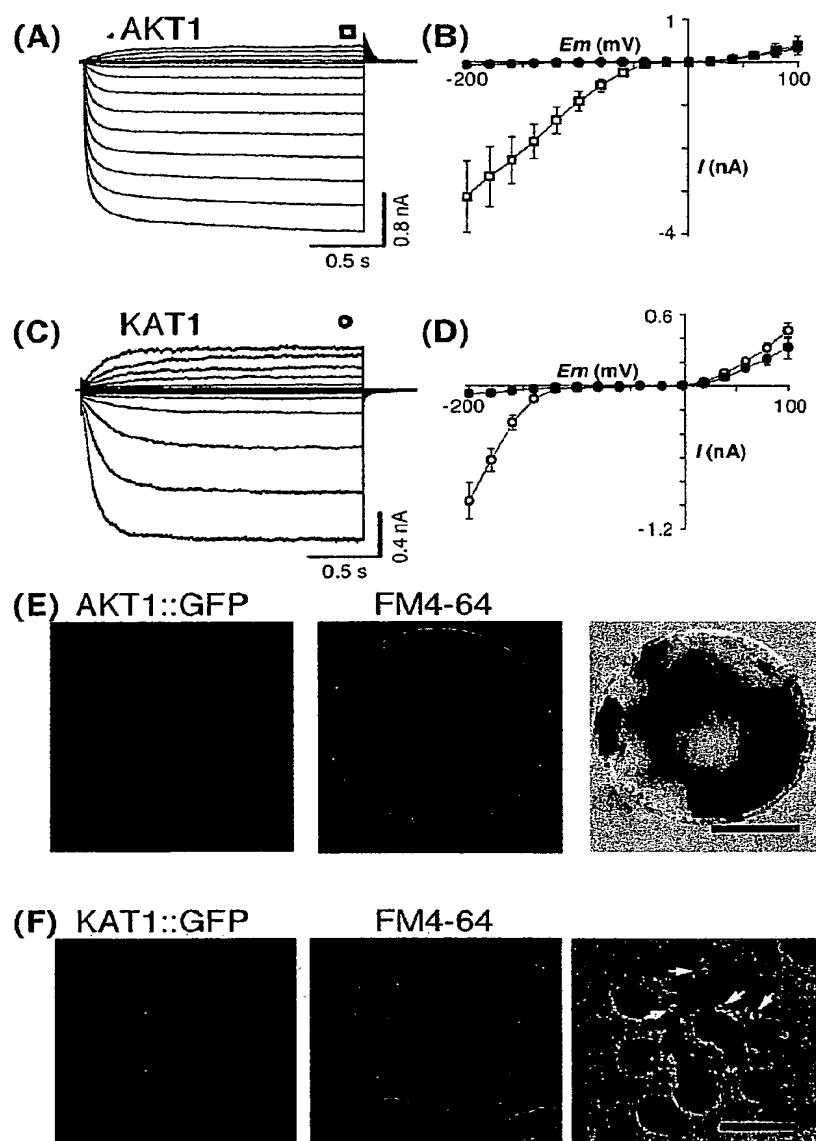
In summary, due to their moderate native conductances, tobacco mesophyll protoplasts seemed usable for characterisation of heterologously expressed K<sup>+</sup>(cation)- or Cl<sup>-</sup>(anion)-selective channels, preferably those channels mediating inward currents and possibly those mediating outward currents, provided that high heterologous expression level can be achieved.

#### Functional expression and localisation of two inward K<sup>+</sup> channels

In the following, the use of tobacco protoplasts for transient expression of functional channels was evaluated with two model inwardly-rectifying Shaker channels cloned from *Arabidopsis*: AKT1 [32] and KAT1[33].

**Figure 2**

**Native K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> currents in tobacco mesophyll protoplasts transformed by the empty pLoc vector.** (A, B) Typical recordings illustrating the two patterns of whole-cell inward K<sup>+</sup> currents elicited by membrane hyperpolarisation. 35 % of the patch-clamped protoplasts displayed the "no-current" pattern shown in (A). 65 % of the patch-clamped protoplasts displayed the voltage-dependent instantaneous weak current pattern shown in (B). (C) Typical recordings of whole-cell outward K<sup>+</sup> currents elicited by membrane depolarisation on the same protoplasts as in (A) and (B). The voltage steps ranged from -60 mV to -200 mV (A, B) and from -40 mV to +100 mV (C) in +20 mV increments, from a holding potential of -40 mV. The symbol above the records in a-c indicates the time of "steady-state" current sampling. (D) Average (mean  $\pm$  SE, n = 10) of native steady-state K<sup>+</sup> currents in tobacco mesophyll protoplasts plotted against membrane potential. (E) Typical recordings of native whole-cell Cl<sup>-</sup> currents recorded in protoplasts exposed to CsCl in pipette and extracellular solutions (see "Methods"). The voltage steps ranged from -202 mV to +58 mV in +20 mV increments and the holding potential was -22 mV. Dashed line marks zero current level. The symbol above the records indicates the time of "steady-state" current sampling. (F) Average (mean  $\pm$  SE, n = 10) of native steady-state Cl<sup>-</sup> currents in tobacco mesophyll protoplasts plotted against membrane potential. Voltage dependence, at steady state, of the native chloride currents in tobacco mesophyll protoplasts (means  $\pm$  SE; n = 10).  $E_{Cl}$ ,  $E_{Cs}$  and  $E_{Ca}$  represent equilibrium potentials for Cl<sup>-</sup>, Cs<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> respectively (see detailed content of bath and pipette solutions in "Methods").



**Figure 3**  
**Functional expression and subcellular localisation of AKT1 and KAT1 channels in tobacco mesophyll protoplasts.** (A) and (C) Typical recordings of the whole-cell inward and outward  $K^+$  currents in patch-clamped tobacco mesophyll protoplasts respectively transformed with AKT1-carrying and KAT1-carrying pFunct+Tag vectors. The voltage steps ranged from -200 mV to +100 mV in 20 mV increments. The holding potential was 0 mV and -40 mV respectively for AKT1 and KAT1 expressing protoplasts. The symbol above the records in a and c indicates the time of "steady-state" current sampling. (B) and (D) Current-voltage relationships at steady state in control tobacco mesophyll protoplasts (closed circles in both B and D) and in AKT1-expressing (open squares in B) and KAT1-expressing (open circles in d) ones (means  $\pm$  SE;  $n = 16$  for AKT1,  $n = 13$  for KAT1). (E, F) Confocal microscopy sections of protoplasts transformed with AKT1-carrying (E) and KAT1-carrying (F) pLoc vectors. The left panels display protoplast sections analysed for the GFP fluorescence, the middle panels the same sections analysed for chloroplast auto-fluorescence and FM4-64 fluorescence and the right panels the overlay of the two former panels with the transmission light image from the same protoplast section. FM4-64 was 50  $\mu$ M in both (E) and (F) and was incubated for 10 min on ice in (E) and for 40 min at room temperature in (F). Some places where GFP and FM4-64 fluorescence co-localises are marked by white arrows in (F). Scale bar = 20  $\mu$ m.

AKT1 had to be tested as it has only been functionally expressed in *Sf9* (insect) cells [16] and yeast cells [32,34], but neither in *Xenopus* oocytes nor in COS cells so that this channel has been much less studied than KAT1. In contrast, the activity of KAT1 has successfully been recorded in a large set of heterologous expression systems: *Xenopus* oocytes [35,36], COS cells [37], *Sf9* cells [38], yeast cells [34,39], tobacco mesophyll protoplasts [17] and *Vicia faba* guard cell protoplasts [21]. This strikingly compliant plant Shaker subunit has therefore been the most extensively described one, becoming the model plant Shaker channel for structure-function analysis. It was here used as a positive control of the usability of the transiently transformed tobacco protoplasts.

When patch-clamped, the GFP-labelled protoplasts transformed with the *pFunct+Tag-AKT1* vector displayed exogenous voltage-gated K<sup>+</sup> currents, activating below a *ca.* -40 mV voltage threshold, exhibiting time dependent activation and inward rectification (Figure 3A) and reversing at a membrane potential close to the equilibrium potential for K<sup>+</sup> ions (not shown). These currents were similar to those observed in *Sf9* cells infected by AKT1-recombinant baculoviruses [16] or to the native ones recorded in root hairs of *atkc1-1* knock-out plants, which are likely to express homomeric AKT1 channels [40]. An average (mean  $\pm$  SE, n = 16) steady-state current/voltage curve for control and AKT1-expressing protoplasts is shown (Figure 3B) to highlight the marked change in inward currents, the outward currents being unchanged.

Electrophysiological recordings on *pFunct+Tag-KAT1*-transformed protoplasts revealed large exogenous inward-rectifying K<sup>+</sup> currents, which exhibited typical features of KAT1 currents [41], such as a time-dependent activation below a negative voltage threshold (here, *ca.* -120 mV; Figs. 3c and 3d).

The values of the voltage-gating parameters (activation threshold potential and, when available, so-called "Boltzmann" parameters, *i.e.* half-activation potential and apparent gating charge) previously obtained either in native or in heterologous contexts for AKT1 and KAT1 channels are compared to the ones obtained for these channels in the present work (Table 1). It appears that the values of these parameters depend on the expression context but that the present ones obtained in tobacco are closer to those obtained in the native context (*Arabidopsis*) than those obtained in animal or yeast cells.

Protoplasts transformed with the *pLoc-AKT1* vector displayed a green fluorescence distribution (Figure 3E, left photograph) suggesting targeting of the AKT1::GFP fusion protein to the cell plasma membrane. This was assessed by the green fluorescence co-localisation (Figure 3E, right

photograph) with the red fluorescence of the membrane-marker FM4-64 (10 min incubation, Figure 3E, middle photograph). This pattern contrasted with the one displayed by protoplasts expressing GFP alone (not shown here but see Figure 4A, below). The membrane localisation of the GFP fluorescence in *pLoc-AKT1* transformed protoplasts was fairly stable.

The situation was quite different with *pLoc-KAT1* transformed protoplasts: the KAT1-attached GFP fluorescence was found essentially localised to 1 to 4  $\mu$ m diameter structures (Figure 3F, left). These structures were assumed to be endocytic vesicles [42]. In order to check this hypothesis, the FM4-64 dye was incubated for 40 min with the protoplasts (Figure 3F, middle), a time allowing endocytic vesicles that appear upon vesicular internalisation of the plasma membrane to be labelled [43]. Many KAT1::GFP-labelled structures also displayed the red FM4-64 fluorescence (Figure 3F, right), suggesting that KAT1::GFP had undergone endocytosis. Similar intracellular GFP-labelled structures were already observed in KAT1::GFP-expressing *Vicia* guard cells and were also suggested to belong to the endocytic pathway [21].

#### **Co-expression of two polypeptides**

The possibility of obtaining co-expression of two distinct polypeptides located on two different plasmids, as reported previously [28], was also tested using the present experimental procedures. PEG-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts was attempted with a mixture of an empty *pLoc* vector and either *pFunct-AKT1* or *pFunct-KAT1*. After this step, those cells having integrated the latter vector were spotted by green fluorescence. When patch-clamped, all the GFP-tagged protoplasts (of 25 AKT1 co-transformed protoplasts or of 23 KAT1 co-transformed ones) displayed exogenous currents (of AKT1- and KAT1-type, respectively). This evidenced that both vectors present in the transformation mixture were expressed in 100% of the transformed protoplasts.

#### **Transformed protoplasts can be used for at least 24 hours in patch-clamp experiments**

To determine the best conditions for patch-clamp recordings in transformed tobacco protoplasts, the kinetics of green fluorescence apparition (reporting the expression of the exogenous proteins) and the kinetics of the wall reconstruction (limiting the access to the membrane for the pipette) were studied.

In a preliminary step, it was verified that every cell harbouring GFP expression that was patch-clamped displayed an exogenous conductance due to the activity of the studied channel (KAT1 and AKT1 channels being used as controls for functional expression of heterologous polypeptides). Green fluorescence (Figure 4A, left) was

**Table I: A comparison of the values of voltage-gating parameters of KAT1 and AKT1 channels in different expression contexts (see text).**

Channel	Mean value for voltage-gating parameters of the channel in						References	
	Animal cells			Yeast cells		Plant cells		
	Xenopus oocytes	insect cells ( <i>Sf9</i> )	Green monkey cos cells		Tobacco mesophyll cells	Arabidopsis native cells		
AKT1	Activation potential (mV)	No current <sup>(1)</sup>	-70/-80 <sup>(1)</sup>	No current <sup>(2)</sup>	-140 <sup>(3)</sup>	-40	-40 <sup>(4)</sup>	
	Gating charge	No current <sup>(1)</sup>	1.5 <sup>(1)</sup>	No current <sup>(2)</sup>	n.r. <sup>(3)*</sup>	1.3 ± 0.2 (n = 5)	n.r. <sup>(4)*</sup>	
	Half-activation potential (mV)	No current <sup>(1)</sup>	-123 <sup>(1)</sup>	No current <sup>(2)</sup>	n.r. <sup>(3)*</sup>	-95 ± 10 (n = 5)	n.r. <sup>(4)*</sup>	
KAT1	Activation potential (mV)	-80 <sup>(5)</sup>	-60/-80 <sup>(6)</sup>	-100 <sup>(7)</sup>	-120 <sup>(3)</sup>	-120	-120 <sup>(8)</sup>	
	Gating charge	1.7 ± 0.2 (n = 5) <sup>(9)</sup>	n.r. <sup>(6)*</sup>	1.6 <sup>(7)</sup>	n.r. <sup>(3)*</sup>	1.7 ± 0.1 (n = 4)	1.6 ± 0.2 (n = 5) <sup>(10)</sup>	
	Half-activation potential (mV)	-138 ± 7 (n = 5) <sup>(9)</sup>	n.r. <sup>(6)*</sup>	-135 <sup>(7)</sup>	n.r. <sup>(3)*</sup>	-164 ± 6 (n = 4)	-157 ± 7 (n = 5) <sup>(10)</sup>	

<sup>(1)</sup> Ref [16]<sup>(2)</sup> Erwan Michard, unpublished<sup>(3)</sup> Ref. [34]<sup>(4)</sup> Ref. [40]<sup>(5)</sup> Ref. [35]<sup>(6)</sup> Ref. [38]<sup>(7)</sup> Ref. [37]<sup>(8)</sup> Ref. [46]<sup>(9)</sup> Ref. [36]<sup>(10)</sup> Eric Hosy, unpublished

\* not reported by these authors

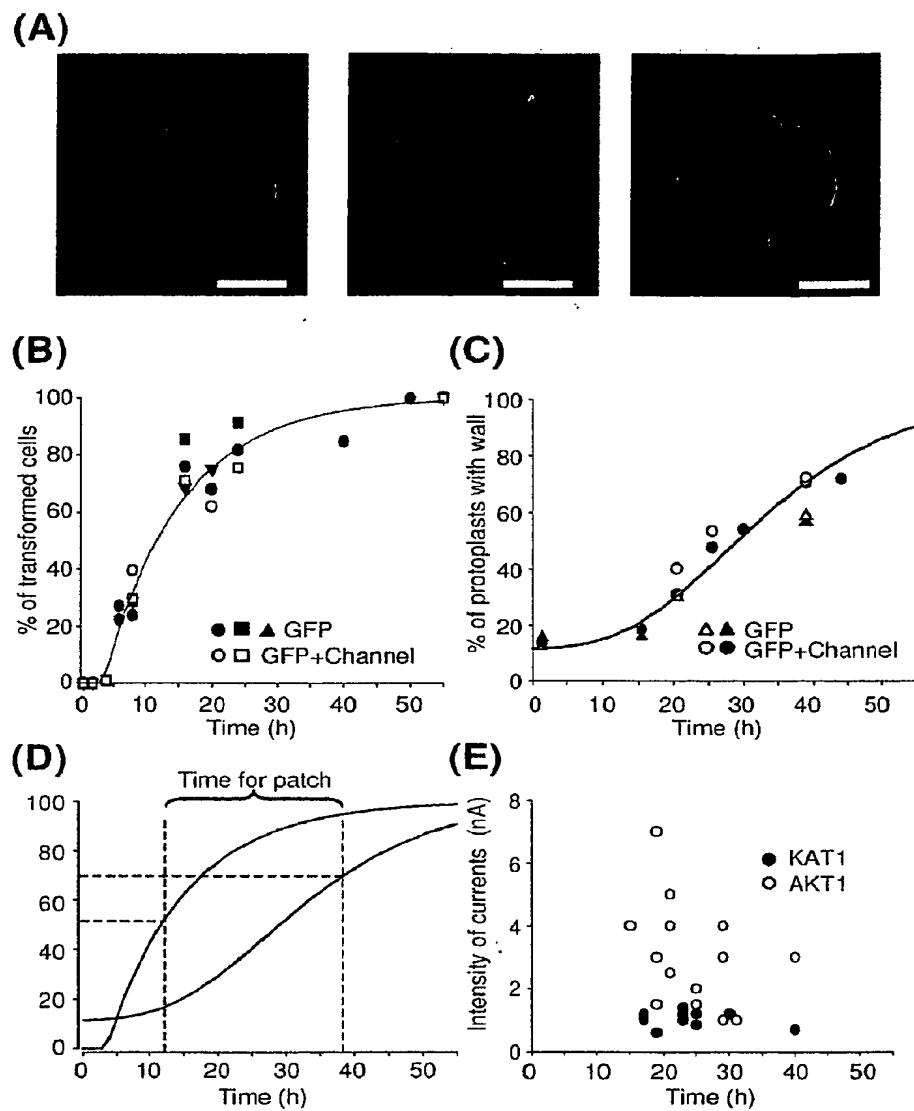
detectable as soon as 4 hours after the transformation step and the number of GFP-labelled cells subsequently reached a plateau by 55 hours following the transformation event (Figure 4B). Once this steady-state was reached, the yield of transformation could be estimated: it averaged 20 %. Interestingly, with respect to this final ratio of GFP-tagged cells, the time-course of the proportion of cells showing green fluorescence was fairly reproducible and poorly dependent on whether a channel was co-expressed or on which construct was used for this co-expression (Figure 4B). Operationally, one GFP-tagged cell amongst fifteen is an acceptable threshold for attempting patch-clamping on a cell culture dish. Hence, with a transformation efficiency of 20 %, the number of GFP-tagged cells on a dish was large enough to attempt patch-clamp recordings about 12 hours after the transformation process (Figure 4B).

In a second set of experiments, detection of cell wall regeneration by transformed protoplasts was monitored (Figure 4A, middle and right), using the calcofluor dye (Fluorescent brightener 28; Sigma). Except for the *ca.* 15 % of mis-digested protoplasts, which were stained immediately after the transformation, the first neo-synthesised cell wall pieces could be detected by 20 hours after the

transformation (Figure 4C). Expression of GFP or both GFP and channel did not merely change the wall synthesis kinetics (Figure 4C). Sixty to 70 % of the protoplasts had synthesised (pieces of) a new wall by 40–45 hours after the transformation (Figure 4C), so that it became subsequently difficult to get good access to the membrane with the patch pipette.

These observations mean that the patch-clamp recordings can begin 12 hours after the transformation (expression time) and the currents can be measured up to 40 hours after the transformation. The time window for protoplasts usability is therefore at least 24 hours wide (Figure 4D). Interestingly, current intensity at -200 mV (here related to channel expression level) did not markedly increase with time after transformation (Figure 4E) and the expression level of channels in the membrane was high enough to record macroscopic currents as soon as GFP fluorescence was detectable.

In an attempt to extend the time allowed for patch-clamping, the newly synthesised cell wall was exposed to the previously used digest solution or to a solution enriched in enzymes. After 1, 2 or 5 hours of digestion, however, the quality of cell membrane obtained did not allow

**Figure 4**

**Widening the time allowed for patch-clamp recordings.** (A) Confocal microscopy sections of tobacco mesophyll protoplasts transformed with empty "localisation" plasmids (control protoplasts). Left panel: protoplast analysed for GFP detection. Middle and right panels: images of protoplasts bathing in calcofluor dye solution respectively without and with wall. Bar = 20  $\mu$ m. (B) Time-course of GFP expression in transformed tobacco mesophyll protoplasts. The number of cells displaying GFP expression at a given time after transformation is expressed as a percentage of the number of cells which finally (55 hours after transformation) expressed GFP. Closed symbols: 3 independent transformations with empty pLoc ("GFP"). Open symbols: 2 independent transformations with pFunct+Tag-KAT1 ("channel+GFP"). About 500 transformed cells were considered for each experiment. Line represents exponential fit of the data. (C) Time-course of cell wall regeneration. The cell wall was marked with calcofluor dye. A cell was considered to have a wall if part of its surface showed blue staining. Each point represents about 200 protoplasts. Triangles and circles represent protoplasts transformed respectively with empty pLoc and pFunct+Tag-KAT1. Dark symbols represent all the protoplasts and open symbols those displaying green fluorescence. Line represents sigmoidal fit of the data. (D) Operational time window for patch-clamp recordings. Superimposition of the GFP apparition and cell wall synthesis fitted curves allows determination of a time frame for patch-clamp experiments (see text). (E) Time-course of the amplitude of steady-state currents recorded at -200 mV in tobacco mesophyll protoplasts transformed with pFunct+Tag-KAT1 (dark symbols) or pFunct+Tag-AKT1 (open symbols).

gigaseals. It could be hypothesised that isolated protoplasts generated walls with a composition different from that of leaf mesophyll cell walls, and that the enzyme cocktail could not permit a complete new digestion.

## Discussion

*In vitro* tobacco culture is straightforward and tobacco mesophyll cells can be obtained in large amounts so that the efficiency of the protoplast preparation is not limiting. The size of these cells is well adapted to the patch-clamp technique, and we observed that the synthesis of a new cell wall, which makes patch-clamping difficult can appreciably be slowed if cells are kept in the dark during digestion and after transformation. We show that, with the experimental procedure we have developed, a high yield of successful transformation can be routinely obtained and that the time frame for patch-clamp investigations is at least 20 hours wide (Figs. 1 and 4).

Endogenous activity of channels mediating K<sup>+</sup> inward currents is low in the PEG-transformed tobacco mesophyll protoplasts (Figure 2). This property is favourable for functional characterisation of inward K<sup>+</sup> channels expressed in this system. Indeed, our data demonstrate the functional expression in these protoplasts of AKT1, a channel so far refractory to expression in classical heterologous expression systems. AKT1 had been previously characterised only in the baculovirus-insect cell system [16] and in yeast cells [34]. Up to now, little has been reported on the functional properties of this channel, one of the first plant Shaker K<sup>+</sup> channels to be cloned [32], essentially because patch-clamping yeast is difficult and functional studies in Sf9 cells require previous purification of recombinant Baculoviruses, a highly time-consuming step, making this system poorly suitable for investigations of structure-function relationships using a number of mutant channels. The present report opens the way towards such investigations, as the expression vectors described here allow easy cDNA cloning and transformation.

A large number of plant genes sharing sequence similarities with animal genes known to encode ion channel subunits have been identified, for instance by *in silico* analysis of the *Arabidopsis* genome <http://aramem.non.botanik.uni-koeln.de/>. Most of them are still uncharacterised at the functional level despite attempts to do this in classical animal expression systems. This is the case, for example, of the plant "glutamate receptor" genes [14] and "CNGCs" ones (putative cyclic nucleotide gated cation channels [12]), two gene families having been proposed to encode cation channels [4], and of the "CLC" genes, likely to encode anion channels [15]. In this context, it can be speculated that ion channels of other types than K<sup>+</sup> inward rectifiers could be characterised in tobacco meso-

phyll protoplasts. Channels mediating outward K<sup>+</sup> currents (Figure 2C) or channels mediating Ca<sup>2+</sup>(Ba<sup>2+</sup>) inward currents and activated by blue light [44] or cAMP [45] have been described in *Arabidopsis* mesophyll cells and are thus likely to be natively expressed also in tobacco mesophyll cells. Even for such channels, high heterologous expression levels in transformed protoplasts might open the way to their functional analyses.

A drawback in the use of heterologous systems is the fact that the expression context can affect channel functional features, providing a distorted view of the channel function and regulation. For example, the values of the voltage-gating parameters for activation of AKT1 and KAT1 clearly depend on the expression context (Table 1). Regarding KAT1, compared to the value obtained for the native hyperpolarisation-activated K<sup>+</sup> channels of *Arabidopsis* guard cells [46], the closest value is the one obtained in the present work (Table 1). Assuming that KAT1 channels do underlie the native *Arabidopsis* guard cell currents, this suggests that tobacco mesophyll protoplasts represent a more realistic expression context for plant ion channels than classically used animal cells.

Amongst the regulation mechanisms that could be studied using the tobacco mesophyll protoplast system are the events that enable channel targeting to the cell membrane and/or post translational modifications such as (de)phosphorylation. Concerning the former mechanisms, it is worth noting that KAT1 displayed the same subcellular localisation profile when expressed in tobacco mesophyll protoplasts as when expressed in *Vicia faba* guard cells [21].

Indeed, although peripheral localisation of (at least some) KAT1 channels is assessed by the exogenous currents recorded in protoplasts transformed by KAT1-carrying pFunct+Tag vectors (Figure 3B-D), KAT1::GFP is hardly seen at the membrane (Figure 3F) but rather appears, both in tobacco mesophyll protoplasts and *Vicia faba* guard cells, as mainly localised in punctate structures (Figure 3F), assumed to belong to the endocytosis pathway (Figure 3F, right photograph; [21]). Interestingly in AKT1::GFP-expressing protoplasts, the fluorescence was not seen in such punctate structures, but appeared as evenly distributed in the plasma membrane (Figure 3E). This indicates that KAT1 and AKT1 channels do not undergo the same regulation concerning their targeting to and/or withdrawal from the cell membrane. Thus, it can be proposed that regulation of K<sup>+</sup> Shaker channel activity involves specific control of the turn-over of the different Shaker subunits in the cell membrane.

A current challenge in ion channel research is the identification of regulatory proteins and the characterisation of

the interacting networks they belong to. Progress in this field could be achieved by co-transformation of candidate partners in heterologous systems [47]. The possibility of obtaining co-expression of two distinct polypeptides located on two different plasmids is, therefore, a key feature of an appropriate heterologous expression system. This point had already been checked by immunostaining the nitrocellulose-transferred proteome from protoplasts expressing two different peptides [28]. Here, it has been assessed *in situ* within living cells and we conclude that PEG-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts with a mixture of two vectors can be used to study the interaction of two polypeptides. These could be different channel subunits, or a channel subunit and a regulating partner, or any couple of putative interacting polypeptides. Depending on the vectors used, one could study the effect of the interaction on the cellular localisation or on the function of the polypeptides of interest.

## Conclusion

In conclusion, we show that transient expression in tobacco mesophyll protoplasts can provide a way to characterise plant ion channels, by studying for instance their subcellular localisation, functional properties, structure-function relationships, interacting partners and regulation, very likely in a more realistic context than the classically used animal systems. Clearly, the system is well adapted to characterisation of inward K<sup>+</sup> channels, and it can be expected to be usable also for the characterisation of other types of ion channels, such as poorly selective cation channels [48,49] or anion channels [15]. Furthermore, adaptation of the procedure to protoplasts prepared from *Arabidopsis* tissues, using plants of different genotypes, could provide even more straightforward routes to such analyses.

## Methods

### Plant material

*Nicotiana tabacum* (cv. SR1) plants were grown *in vitro* in a growth chamber at 22°C with a 16-h light/8-h dark regime with a photon flux density of 250 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> on 0.8% agar medium containing MS/2 salts [50], 1% sucrose and 5 mM MES-KOH pH 5.5).

### Genetic material

The vectors used for transient expression in tobacco mesophyll protoplasts contained either one expression cassette or two. Each cassette is fitted with the enhanced plant promoter of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoform 4 gene (*pma4*) from *Nicotiana plumbaginifolia* and the nopaline synthase terminator from *Agrobacterium tumefaciens* (see text and Figure 1A-C). The modified pTZ-19U (Stratagene, LaJolla, CA, USA) plasmid used for functional expression of Shaker channel cDNA in tobacco protoplasts contained two cassettes, allowing to co-express

the GFP fluorescent marker protein and the Shaker cDNA sequence (*pFunct+Tag*, Figure 1B). XbaI and SmaI restriction sites were used to clone AKT1 and KAT1 cDNA into the expression cassette. The plasmid used for channel targeting contained only one expression cassette allowing the expression of a channel fused in its C-terminal part to the GFP protein (*pLoc*, Figure 1A). BglII restriction site and KpnI or BamHI sites were used to clone upstream the GFP, the AKT1 cDNA deprived of its STOP codon by PCR. Supplemental information on the vectors and on the cloning procedure used in this study is available as Additional file 1.

### Tobacco leaf mesophyll protoplast isolation

A previously described protocol [27] was adapted for obtaining purified leaf mesophyll protoplasts.

Five cm long tobacco leaves from 3- to 4-week-old plants grown *in vitro* were harvested under sterile conditions and their lower face was abraded with sandpaper n° 1200. The leaves were then laid in Petri dishes containing 10 ml of the sterilised digestion EF medium (0.125% macerozyme R-10 (Yakult Pharmaceutical; Onozuka, Japan), 0.2% cellulase R-10 (Yakult Pharmaceutical; Onozuka, Japan), 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 M sucrose, 0.1 % BSA, 2.5 MES-HCl, pH 5.2) for 19 h in the dark at 25°C. After digestion, undigested pieces of leaves were removed and 4 ml of floating ML06 medium were added (15 mM CaCl<sub>2</sub>, 600 mM sucrose, 7.5 mM MES-KOH pH 6.0). The protoplast suspension was then filtered through a 100 μm nylon filter and centrifuged at 110 g for 7 min in a swinging rotor. The protoplasts localised in the floating band were harvested and diluted with 4 volumes of autoclaved washing W5 medium (154 mM NaCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 5 mM glucose and 1.5 mM MES-KOH, pH 5.6). The cells were then pelleted (110 g for 7 min in a swinging rotor) and washed in 40 ml and then in 20 ml of "Mannitol/Mg" solution (15 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM mannitol, 5 mM MES-KOH pH 5.6). Protoplasts were finally resuspended in Mannitol/Mg solution at a concentration of 10<sup>6</sup> cells/ml.

### Protoplast transformation

In an Eppendorf tube, 150 μl of the concentrated protoplasts and 150 μl of PEG solution (25% w/v PEG 6000, 0.45 M mannitol, 0.1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, pH 9.0) were added to 5 μg of plasmidic DNA from the construction to be tested and incubated at room temperature for 30 min. The sample was then diluted with 8 ml of K3M medium supplemented with 0.45 M glucose [25] and pelleted in a swinging rotor (7 min at 110 g). The protoplasts were finally suspended in 3 ml of K3M and incubated for 12 to 38 hours at 19°C in the dark before analysis.

### **Subcellular localisation of channels fused to the GFP and detection of transformed protoplasts for electrophysiological measurements**

Subcellular localisation of the channels fused to the GFP and of FM4-64 labelling in tobacco protoplasts was performed with a Zeiss confocal microscope (LSM510 AX70 Zeiss, Göttingen, Germany). For catching the GFP fluorescence, an excitation wavelength of 488 nm and a detection one between 500 and 530 nm were used. For catching the FM4-64 fluorescence, in KAT1::GFP expressing protoplasts, an excitation wavelength of 515 nm and a detection one above 640 nm were used, with a laser intensity at 60%. Different settings for FM4-64 detection were used in AKT1::GFP expressing protoplasts: excitation at 543 nm, detection above 585 nm and laser intensity at 15% (much lower chloroplast autofluorescence was caught with such settings, see Figure 3E). Images were treated with LSM510 software (Zeiss). Plasma membrane FM4-64 labelling was performed by incubating the protoplasts on ice 10 min in the culture medium supplemented with 50 μM FM4-64. For endocytic vesicle labelling, the incubation in 50 μM FM4-64 was prolonged up to 40 min and performed at room temperature. In order to measure currents only on transformed protoplasts, an epifluorescent microscope (IX 70, Olympus, Hamburg, Germany) allowing GFP detection was combined with a patch-clamp set-up. Transformed cells were selected for patch-clamp analysis according to their GFP expression. GFP signal was detected between 489 nm and 508 nm using a emission filter (piston-GFP, Olympus) upon excitation at a wavelength of 488 nm emitted by a monochromator (Optoscan C80x, Cairn Research Ltd, UK). Images were acquired with a CCD camera (CoolSNAP HQ, Roper Scientific, USA) and treated with MetaFluor software (Universal Imaging Corporation, USA).

### **Wall detection**

To measure the kinetics of wall synthesis, the calcofluor white marker (Fluorescent brightener 28, Sigma) was solubilised in 0.25 M Tris solution at the 0.005% w.v<sup>-1</sup> concentration. The calcofluor was excited with a 360–370 nm wavelength and detected at above 420 nm with a high-pass emission filter (U-MNU2, Olympus) on an epifluorescent microscope (BX61, Olympus).

### **Electrophysiological recording**

Patch-clamp pipettes were pulled (P97, Sutter Instruments, Novato, CA) from borosilicate capillaries (Kimax-51, Kimble). Seals with resistances higher than 1 GΩ were used for electrophysiological analyses. Whole-cell recordings were obtained using an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). pCLAMP 8 software (Axon Instruments) was used for voltage pulse stimulation, on-line data acquisition and data analysis. The volt-

age pulse protocols have been included in the figure legends.

### **Electrophysiological solutions**

For potassium current recordings, the pipette solution that equilibrates with the cytosol of mesophyll protoplasts contained 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM K-glutamate, 2 mM MgATP, 10 mM Hepes-NaOH, pH 7.5, osmolarity adjusted to 520 mOsM with D-mannitol. Mesophyll protoplasts were extracellularly perfused with a solution containing 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM K-glutamate, 10 mM MES-HCl, pH 5.5, osmolarity adjusted to 500 mOsM with D-mannitol. In these conditions, pipette resistances were about 12 MΩ.

The pipette solution used for chloride current recordings was composed of 30 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> (free Ca<sup>2+</sup> about 50 nM), 5 mM EGTA, 2 mM MgATP, 10 mM Hepes/Tris (pH 7.2) and 410 mM D-mannitol. The bath solution contained 50 mM CsCl, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Mes/Tris (pH 5.7) and 345 mM D-mannitol. In these conditions, patch pipettes had resistances of about 15 MΩ.

### **Competing interests**

The author(s) declare that they have no competing interests.

### **Authors' contributions**

EH carried out the patch-clamp recordings, except those regarding endogenous anion currents, participated in the protoplast transformation and drafted the manuscript. GD designed and obtained the expression vectors used in this work, managed the protoplast transformation, performed the confocal microscopy and drafted the manuscript. AAV performed the patch-clamp recordings of the endogenous anion currents and cell wall detection experiments. AC participated in the protoplast transformation and obtaining of expression vectors. HS participated in the design and the coordination of the study and helped to draft the manuscript. JBT participated in the design and the coordination of the study and managed the writing of the manuscript.

### **Additional material**

#### **Additional File 1**

*Supplemental information on the vectors and on the cloning procedure used in this study. This 2 page file (pdf format) displays 2 figures (and legends) showing (i) a schematic representation of the vectors used in this work and (ii) the procedure for cloning cDNAs in these vectors.*

*Click here for file*

*[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1746-4811-1-14-S1.pdf>]*

## Acknowledgements

Eric Hosy was granted by Région Languedoc-Roussillon and INRA. Geoffrey Duby was supported by European Union (Marie Curie fellowship). Région Languedoc-Roussillon funded the acquisition of the experimental set-up for coupled patch-clamp and GFP imaging ("arrêté distributif n°00 61 67"). This work was in part supported by the "Programme inter-organismes (CEA-CNRS-INRA-INSERM) de Toxicologie Nucléaire". Preliminary attempts of KAT1 functional expression were performed with a KAT1::GFP construct kindly provided by Dr Ulrike Homann, Technical University of Darmstadt, Germany. We warmly thank Dr Françoise Bex (Laboratory of Microbiology, University of Brussels, Belgium) for her help in confocal microscopy. We are indebted to Dr Isabel A. Lefèvre for helpful discussions and comments on the manuscript.

## References

- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, et al: Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 1984, 312:121-127.
- Sumikawa K, Houghton M, Emtage JS, Richards BM, Barnard EA: Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in Xenopus oocytes. *Nature* 1981, 292:862-864.
- Zimmermann S, Sentenac H: Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Curr Opin Plant Biol* 1999, 2:477-482.
- Véry A-A, Sentenac H: Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 2003, 54:575-603.
- Stühmer W: Electrophysiologic recordings from Xenopus oocytes. *Methods Enzymol* 1998, 293:280-300.
- Luckov VA, Summers MD: Signals important for high-level expression of foreign genes in Autographa californica nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* 1988, 167:56-71.
- Rychkov GY, Pusch M, Astill DS, Roberts ML, Jentsch TJ, Bretag AH: Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel ClC-1. *Journal of Physiology* 1996, 497:423-435.
- Ukomadu C, Zhou J, Sigworth FJ, Agnew WS: m1 Na<sup>+</sup> channels expressed transiently in human embryonic kidney cells: biochemical and biophysical properties. *Neuron* 1992, 8:663-676.
- Mellon P, Parker V, Gluzman Y, Maniatis T: Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system. *Cell* 1981, 27:279-288.
- Gu Y, Franco A Jr, Gardner PD, Lansman JB, Forsayeth JR, Hall ZW: Properties of embryonic and adult muscle acetylcholine receptors transiently expressed in COS cells. *Neuron* 1990, 5:147-157.
- Dreyer I, Antunes S, Hoshi T, Müller-Röber B, Palme K, Pongs O, Reintanz G, Hedrich R: Plant K<sup>+</sup> channel α-subunits assemble indiscriminately. *Biophys J* 1997, 72:2143-2150.
- Talke IN, Blaudez D, Maathuis MJ, Sanders D: CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends Plant Sci* 2003, 8:286-293.
- Lacombe B, Becker D, Hedrich R, DeSalle R, Hollmann M, Kwak JM, Schroeder JI, Le Novère N, Nam HG, Spalding EP, et al: The identity of plant glutamate receptors. *Science* 2001, 292:1486-1487.
- Bouche N, Lacombe B, Fromm H: GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends Cell Biol* 2003, 13:607-610.
- Barbier-Brygoo H, Vinauger M, Colcombet J, Ephrithikhine G, Frachebois J, Maurel C: Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochimica Biophysica Acta* 2000, 1465:199-218.
- Gaynard F, Cerutti M, Horeau C, Lemaillat G, Urbach S, Ravellec M, Devauchelle G, Sentenac H, Thibaud J-B: The baculovirus/insect cell system as an alternative to Xenopus oocytes. First characterization of the AKT1 K<sup>+</sup> channel from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 1996, 271:22863-22870.
- Bei Q, Luan S: Functional expression and characterization of a plant K<sup>+</sup> channel in a plant cell model. *Plant J* 1998, 13:857-865.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholz D, Rogers SG, Fraley RT: A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 1985, 237:1229-1231.
- Sheen J, Hwang S, Niwa Y, Kobayashi H, Galbraith DW: Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J* 1995, 8:777-784.
- Plautz JD, Day RN, Dailey GM, Welsh SB, Hall JC, Halpin S, Kay SA: Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. *Gene* 1996, 173:83-87.
- Hurst AC, Meckel T, Tayefeh S, Thiel G, Homann U: Trafficking of the plant potassium inward rectifier KAT1 in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant J* 2004, 37:391-397.
- Gustafson CE, Levine S, Katsura T, McLaughlin M, Aleixo MD, Tamrapoor BK, Verkman AS, Brown D: Vasopressin regulated trafficking of a green fluorescent protein-aquaporin 2 chimera in LLC-PK1 cells. *Histochem Cell Biol* 1998, 110:377-386.
- Duby G, Oufattole M, Boutry M: Hydrophobic residues within the predicted N-terminal amphiphilic alpha-helix of a plant mitochondrial targeting presequence play a major role in *in vivo* import. *Plant J* 2001, 27:539-549.
- Zhao R, Morlau L, Boutry M: Expression analysis of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase pma4 transcription promoter from *Nicotiana plumbaginifolia* activated by the CaMV 3SS promoter enhancer. *Plant Sci* 1999, 149:157-165.
- Negrutiu I, Hinnisdael S, Cammaerts D, Cherdshewasart W, Gharti-Chhetri G, Jacobs M: Plant protoplasts as genetic tool: selectable markers for developmental studies. *International Journal of Developmental Biology* 1992, 36:73-84.
- Maathuis FJM, May ST, Graham NS, Bowen HC, Jelitto TC, Trimmer P, Bennett MJ, Sanders D, White PJ: Cell marking in *Arabidopsis thaliana* and its application to patch-clamp studies. *Plant J* 1998, 15:843-851.
- Lukaszewicz M, Jerouville B, Boutry M: Signs of translational regulation within the transcript leader of a plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene. *Plant J* 1998, 14:413-423.
- Locatelli F, Vannini C, Magnani E, Coraggio I, Bracale M: Efficiency of transient transformation in tobacco protoplasts is independent of plasmid amount. *Plant Cell Rep* 2003, 21:865-871.
- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R: GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. *FEBS Lett* 2000, 486:93-98.
- Gaynard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, Michaux-Ferrière N, Thibaud J-B, Sentenac H: Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell* 1998, 94:647-655.
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaynard F, Porée F, Boucherez J, Lebady A, Bouchez D, Véry A-A, et al: The *Arabidopsis* outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:5549-5554.
- Sentenac H, Bonneau N, Minet M, Lacroix F, Salmon JM, Gaynard F, Grignon C: Cloning and expression in yeast of plant potassium ion transport system. *Science* 1992, 256:663-665.
- Anderson JA, Huprikar SS, Kochian LV, Lucas WJ, Gaber RF: Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:3736-3740.
- Bertl A, Reid JD, Sentenac H, Slayman CL: Functional comparison of plant inward-rectifier channels expressed in yeast. *J Exp Bot* 1997, 48:405-413.
- Schachtman DP, Schroeder JI, Lucas WJ, Anderson JA, Gaber RF: Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA. *Science* 1992, 258:1654-1658.
- Véry A-A, Gaynard F, Bosseux C, Sentenac H, Thibaud J-B: Expression of a cloned plant K<sup>+</sup> channel in *Xenopus* oocytes: analysis of macroscopic currents. *Plant J* 1995, 7:321-332.
- Su Y-H, North H, Grignon C, Thibaud J-B, Sentenac H, Véry A-A: Regulation by external K<sup>+</sup> in a maize inward Shaker channel targets transport activity in the high concentration range. *Plant Cell* 2005, 17:1532-1548.
- Marten I, Gaynard F, Lemaillat G, Thibaud J-B, Sentenac H, Hedrich R: Functional expression of the plant K<sup>+</sup> channel KAT1 in insect cells. *FEBS Lett* 1996, 380:229-232.

39. Berd A, Anderson JA, Slayman CL, Gaber RF: **Use of *Saccharomyces cerevisiae* for patch clamp analysis of heterologous membrane proteins: characterization of Kat1, an inward-rectifying K<sup>+</sup> channel from *Arabidopsis thaliana*, and comparison with endogenous yeast channels and carriers.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:2701-2705.
40. Reintanz B, Szyroki A, Ivashikina N, Ache P, Godde M, Becker D, Palme K, Hedrich R: **AtKCI, a silent *Arabidopsis* potassium channel alpha -subunit modulates root hair K<sup>+</sup> influx.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:4079-4084.
41. Dreyer L, Horeau C, Lemaillet G, Zimmermann S, Bush DR, Rodriguez-Navarro A, Schachtman DP, Spalding EP, Sentenac H, Gaber RF: **Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems.** *J Exp Bot* 1999, **50**:1073-1087.
42. Haupt S, Cowan GH, Ziegler A, Roberts AG, Opara KJ, Torrance L: **Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway.** *Plant Cell* 2005, **17**:164-181.
43. Ueda T, Yamaguchi M, Uchimiya H, Nakano A: **Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*.** *EMBO J* 2001, **20**:4730-4741.
44. Stoezle S, Kagawa T, Wada M, Hedrich R, Dietrich P: **Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:1456-1461.
45. Lemtiri-Chlieh F, Berkowitz GA: **Cyclic adenosine monophosphate regulates calcium channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* leaf guard and mesophyll cells.** *J Biol Chem* 2004, **279**:35306-35312.
46. Roelfsema MRG, Prins HBA: **Ion channels in guard cells of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.** *Planta* 1997, **202**:18-27.
47. Chérel I, Michard E, Plateet N, Mouline K, Alcon C, Sentenac H, Thibaud J-B: **Physical and functional interaction of the *Arabidopsis* K<sup>+</sup> channel AKT2 and phosphatase AtPP2CA.** *Plant Cell* 2002, **14**:1133-1146.
48. Demidchik V, Davenport RJ, Tester M: **Nonselective cation channels in plants.** *Annu Rev Plant Biol* 2002, **53**:67-107.
49. Véry A-A, Sentenac H: **Cation channels in the *Arabidopsis* plasma membrane.** *Trends Plant Sci* 2002, **7**:168-175.
50. Murashige T, Skoog F: **A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissues culture.** *Physiol Plant* 1962, **15**:473-497.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

*"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."*

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



### III.3.- Rôle de la sous-unité silencieuse AtKC1

#### III.3.1.- Présentation de l'article 3

Le contrôle de l'osmolarité et de la polarisation électrique cellulaire nécessite une régulation des flux de potassium et par conséquent une régulation de l'activité des canaux Shaker qui assurent l'essentiel de la conductance potassique de la membrane plasmique. Outre les régulations qui concernent la transcription et la traduction des gènes codant les sous-unités constitutives de ces canaux, d'autres voies de régulation concernent l'activité elle-même des canaux Shaker. Ces voies de régulation post-traductionnelles impliquent des messagers secondaires comme le pH (intra et/ou extracellulaire), le calcium et les nucléotides cycliques, ainsi que des phosphorylations. Il est également possible qu'à l'instar des canaux Shaker animaux, les canaux voltage-dépendants des plantes s'assemblent en hétéromères, *i.e.* à partir de sous-unités codées par des gènes différents, ce qui représenterait une autre voie de régulation. Le processus d'hétéro-tétramérisation des canaux Shaker animaux a été abondamment décrit dans la littérature. Il a été démontré par exemple que parmi les 11 sous-familles de canaux Shaker sortants identifiées chez l'homme (26 gènes), seulement 4 sous-familles codent des protéines capables de catalyser des flux de K<sup>+</sup> sous forme d'homo-tétramères (7 Kv1, 2 Kv2, 4 Kv3 et 3 Kv4), pour les 7 autres sous familles (comportant en tout dix gènes) l'adressage du polypeptide codé à la membrane et/ou la fonction de transport est conditionnée par une hétéro-tétramérisation (Hugnot et al., 1996; Post et al., 1996; Salinas et al., 1997; Ottschyttsch et al., 2002).

Cette hétéromérisation des canaux permet une modulation et une régulation des propriétés fonctionnelles des sous-unités "actives" (capables de catalyser un flux sous forme d'homotétramère) par les sous-unités "silencieuses" (incapables, exprimées seules, de former des tétramères fonctionnels adressés à la membrane). Le canal potassique cardiaque Kv 2.1, par exemple, est capable de s'assembler avec de nombreuses autres sous-unités Kv dont l'expression dépend des conditions physiologiques. Chaque hétéromère ainsi formé possède des caractéristiques d'activation ou de désactivation temps et/ou voltage dépendante propre (Patel et al., 1997; Kerschensteiner et al., 2003; Vega-Saenz de Miera, 2004).

Les canaux potassiques animaux de type HCN sont structurellement voisins des Shaker sortants des cellules animales mais sont activés par l'hyperpolarisation membranaire (rectification entrante). Ils sont donc plus ou moins des homologues fonctionnels des Shaker entrants identifiés chez les plantes. Ils ont été clonés plus récemment et leur mode de régulation est encore peu documenté. Cependant, une interaction fonctionnelle entre les sous-unités HCN1 et HCN2 a été mise en évidence par Xue et ses collaborateurs en 2002. Cette interaction entraîne un léger décalage du potentiel d'activation vers des potentiels plus hyperpolarisés, ainsi qu'une diminution de la vitesse de désactivation voltage dépendante de l'hétéromère (Ulens and Tytgat, 2001; Xue et al., 2002; Robinson and Siegelbaum, 2003).

Chez les plantes, le chevauchement des patrons d'expression de certains gènes Shaker, des tests d'interaction protéine-protéine et certains travaux en contexte hétérologue suggèrent la possibilité d'une régulation de l'activité des canaux via des mécanismes d'hétéro-tétramérisation (Cherel, 2004). Parmi les neuf gènes d'*Arabidopsis thaliana* qui codent des sous-unités de canaux Shaker, un code une sous-unité décrite comme silencieuse (AtKC1; Reintanz et al., 2002).

En étudiant le rôle de la sous-unité AtKC1 par une approche de génétique inverse, Reintanz et ses collaborateurs démontrent que la suppression de l'expression de cette

sous-unité altère les propriétés de gating ainsi que la sélectivité ionique des conductances entrantes présentes sur la membrane des cellules racinaires jusque là attribuées à l'activité du canal AKT1 (Hirsch et al., 1998; Reintanz et al., 2002). Ils confèrent donc à AtKC1 un rôle de sous-unité silencieuse régulant les influx de K<sup>+</sup> dans les poils racinaires, sans toutefois apporter les preuves d'une hétéromérisation entre AKT1 et AtKC1.

L'article suivant présente de nouvelles données électrophysiologiques obtenues en vue de déterminer la fonction de la sous-unité AtKC1 (en utilisant l'expression transitoire en cellules mésophylliennes de tabac présentée dans l'article 2), et décrit un nouveau phénotype issu de l'analyse d'un mutant knock-out de la lignée *atkC1-2*.

En résumé, nous avons observé que la sous-unité AtKC1 régule le potentiel d'activation du canal AKT1, en décalant de -60 mV ou de -120 mV les potentiels d'activation du canal, probablement en fonction de la présence d'une ou deux sous-unités AtKC1 dans l'hétéromère (effet stœchiométrique). Un phénotype similaire est observé lors de l'hétéromérisation entre les sous-unités KAT1 et AtKC1.

Les mesures physiologiques réalisées sur les plantes *atkC1-2* révèlent (par rapport à des plantes de type sauvage) une réduction importante de la concentration foliaire en potassium, surtout aux extrémités des feuilles, une ouverture stomatique plus importante le jour et la nuit, et une plus forte sensibilité aux variations rapides de l'hygrométrie de l'air.

## A conditionally targeted Shaker-type subunit controls the activity of plant K<sup>+</sup> channels

Geoffrey Duby<sup>\*†§</sup>, Eric Hosy<sup>\*‡§</sup>, Cécile Fizames<sup>\*</sup>, Carine Alcon<sup>\*</sup>, Hervé Sentenac<sup>\*</sup> and Jean-Baptiste Thibaud<sup>\*\$</sup>

<sup>\*</sup>Biochimie et Physiologie Moléculaire des plantes, CNRS(UMR-5004)-INRA-SupAgro-UM2, 2 place Viala, F-34060 Montpellier cedex 1, France

<sup>†</sup>Present address: Unité de Biochimie Physiologique, Institut des Sciences de la Vie, Catholic University of Louvain, Croix du Sud, 5-15, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

<sup>‡</sup>Present address: Department of Neuroscience, Erasmus MC, P.O. Box 2040, 3000 CA, Rotterdam, The Netherlands

<sup>§</sup>Contributed equally to this work

<sup>\$</sup>Corresponding author

## Abstract

Amongst the nine voltage-gated K<sup>+</sup> channel, (Kv) subunits expressed in *Arabidopsis*, AtKC1 does not seem to form functional Kv channels on its own and is therefore said to be silent. It has been proposed to be a regulatory subunit and to significantly influence the functional properties of heteromeric channels in which it participates along with other Kv channel subunits. The mechanisms underlying these properties of AtKC1 still remain unknown. Here, the transient (co-)expression of *AtKC1*, *AKT1* and/or *KAT1* genes was obtained in tobacco mesophyll protoplasts, which lack endogenous inward Kv channel activity. Our experimental conditions allowed both localization of expressed polypeptides (GFP-tagging) and recording of heterologously-expressed Kv channel activity (untagged polypeptides). It is shown that AtKC1 remains in the endoplasmic reticulum unless it is co-expressed with AKT1. In these conditions heteromeric AtKC1-AKT1 channels are obtained and display functional properties different from those of homomeric AKT1 channels in the same context. Similar results are obtained upon co-expression of *AtKC1* with *KAT1*. The whole set of data provides evidence that AtKC1 is a conditionally-targeted Kv subunit, which probably down-regulates the physiological activity of other Kv channel subunits in *Arabidopsis*.

word count: 187

## INTRODUCTION

Voltage-gated K<sup>+</sup> (Kv) channels, which mediate sustained K<sup>+</sup> influx or efflux across the cell membrane, are currently the best characterized of the K<sup>+</sup> transport systems encoded by the *Arabidopsis* genome (1). These channels result from the assembly of four so-called alpha-subunits related to the product of the *Shaker* gene identified twenty years ago in *Drosophila* (2).

In animal cells, the four alpha-subunits making a given Kv channel can be identical but in many instances they are not. For example, amongst the 9 subfamilies of genes that encode subunits forming depolarization-activated Kv channels in human cells, only 5 (Kv1, Kv2, Kv3, Kv4 and Kv7) encode subunits able to form functional homo-tetramers (3). The genes from the 4 other subfamilies encode so-called "silent" or "modifier" subunits that must assemble into hetero-tetramers in order to be targeted to the cell membrane in a functional state (4-7). This ability of Kv channel subunits to form either homo-tetramers or hetero-tetramers increases the functional diversity of Kv channels produced by a given number of genes. For example the cardiac Kv2.1 subunit can assemble with a number of other Kv subunits, the expression of which depends on the physiological conditions: each type of resulting heteromeric channel displays its own activation or deactivation kinetics and/or voltage-dependence (8-10).

In *Arabidopsis*, the *Shaker* family comprises 9 members, which can be segregated in five phylogenetic groups, considering both the encoded polypeptidic sequence and the gene structure (11). Genes from group I (*KAT1* and *KAT2*; (12, 13)), group II (*AKT1* (14), *SPIK* (15), and *AKT5*, not yet characterized), and group III (*AKT2* (16)) can produce homo-tetrameric hyperpolarisation-activated K<sup>+</sup> channels when expressed alone in heterologous expression systems. In the same conditions, genes from group V (*GORK* (17) and *SKOR* (18)) can as well produce homo-tetrameric depolarization-activated K<sup>+</sup> channels. On the contrary, *AtKC1*, the single member of group IV, early appeared as unable to form functional channels on its own.

Early attempts to determine the electrophysiological activity of *AtKC1* channels in *Xenopus* oocytes (19) and COS cells (unpublished data) failed, leading to the hypothesis that *AtKC1* is a silent Kv subunit, unable to form functional homo-tetrameric channels (19). Interestingly, when other plant Kv subunits of known functional characteristics (*KAT1* and *KST1*) were co-expressed with *AtKC1* in animal expression systems, their activity appeared to be altered, suggesting that they interacted with *AtKC1* and formed hetero-tetrameric channels endowed with novel properties (19). More recently, patch-clamp experiments on *Arabidopsis* root hair protoplasts (20) provided further support to this hypothesis. Comparison of inward voltage-dependent current recorded in root hairs of wild-type, *atkc1*- and *akt1*- knock-out plants suggested that *AtKC1* contributed to the inward K<sup>+</sup> conductance in the wild-type plants, probably in association with *AKT1* within heteromeric channels (20).

The reason why the *AtKC1* Kv subunit is silent when expressed alone as well as the mechanism by which *AtKC1* interacts with *AKT1* channel activity are still unknown. We investigated these questions by using transiently transformed tobacco mesophyll protoplasts, a plant expression system recently shown to enable functional characterization of inwardly rectifying plant K<sup>+</sup> channels coupled with subcellular localization studies (21). We show that *AtKC1* polypeptides remain in the endoplasmic reticulum unless they are co-expressed with *AKT1*. In this case, heteromeric *AtKC1-AKT1* channels are formed with functional properties that are different from those of homo-tetrameric *AKT1* channels and are probably dependent on the stoichiometry of the two subunits. Similar results were obtained upon co-expression of *AtKC1* with *KAT1* providing direct evidence that *AtKC1* is indeed a silent, conditionally-targeted and regulatory Kv subunit in *Arabidopsis*.

## MATERIALS AND METHODS

### Subcellular localization of channels fused to the GFP and detection of transformed protoplasts for electrophysiological measurements

Analyses of channel subcellular localization and electrophysiological activity were carried out using transiently transformed tobacco leaf mesophyll protoplasts as previously described (21). The protoplasts were incubated for 12 to 38 h at 19°C after transformation. Subcellular localizations of channel-GFP marker constructs and of FM4-64 labeling were performed using a Zeiss confocal microscope (LSM510 AX70Zeiss, Göttingen, Germany). Electrophysiological analyses were carried out in parallel using protoplasts from the same batch but transformed using vectors (21) allowing co-expression of one of the two channel subunits under investigation with GFP as a marker of the transformed cells. The GFP sequence was not fused to the sequence of a channel subunit but inserted separately in the transforming vector. In order to measure currents only from transformed protoplasts, an epifluorescent microscope allowing GFP detection was combined with a patch-clamp set-up. The GFP signal was detected between 489 nm and 508 nm using an emission filter (piston-GFP, Olympus) upon excitation at a wavelength of 488 nm emitted by a monochromator (Optoscan C80x, Cairn research Ltd., UK, (21)).

### 15 **Electrophysiological recording**

GFP-positive protoplasts were analyzed for their exogenous inward K<sup>+</sup> conductance. Patch-clamp pipettes were pulled (P97, Sutter Instruments, Novato, CA) from borosilicate capillaries (Kimax-51, Kimble, Rochester NY) to obtain a pipette resistance of about 12 MΩ in the used solutions. Electrophysiological analyses were performed only when seals with resistances higher than 1 GΩ were obtained. Whole-cell recordings were made using an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). The pCLAMP 8 software (Axon Instruments) was used for voltage-pulse stimulation, on-line data acquisition and data analysis. Unless otherwise stated (see figure legends), the standard protocol consisted of stepping the membrane potential in -20 mV decrements to voltages from 0 or to -200 mV (or from -40 mV to -240 mV, as indicated in the figures). The holding potential was 0 mV. The pipette solution contained 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM K-glutamate, 2 mM MgATP, 10 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), its osmolarity being adjusted to 520 mOsM with D-mannitol. The perfused bath solution contained 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM K-glutamate, 10 mM MES-HCl (pH 5.5), osmolarity adjusted to 500 mOsM with D-mannitol.

### 31 **Modelling tetramer channel assembly from two types of monomers**

The currents recorded in protoplasts co-expressing AtKC1 and AKT1 suggested that different kinds of AtKC1-AKT1 hetero-tetramers were formed (see below). This prompted us to model the assembly of tetramers from a given stock of monomeric alpha subunits of two types (AtKC1 and AKT1), in order to predict the subunit composition of the resulting channels, considering a number of assumptions as stated below (see "Discussion" section). The results displayed in Figure 5 were obtained by performing 1,000 random drawings for dimers from a stock of AtKC1 and AKT1 monomers. The outcomes of these

1,000 runs were averaged to yield a mean dimer stock used subsequently in 1,000 random drawings for tetramers, performed *in silico*.

### RESULTS

#### AtKC1 subcellular localization is changed by AKT1

When expressed alone in tobacco mesophyll protoplasts, the AtKC1::GFP fusion was retained in the ER (Fig. 1A) whereas, in parallel experiments, the AKT1::GFP fusion was targeted to the plasma membrane as indicated by the co-localization of FM4-64 staining (Fig. 1B). Interestingly, when the AtKC1::GFP fusion was co-expressed with AKT1, the fluorescence shifted to the plasma membrane (Fig. 1C). This suggested that some interaction between the two Shaker channel subunits AKT1 and AtKC1 did occur and enabled the latter to escape from the ER and to reach the plasma membrane, probably as a component of heteromeric channels, together with AKT1.

#### Formation of AtKC1-AKT1 heteromers

The patch-clamp technique (whole-cell configuration) was used to study exogenous channel activity resulting from AtKC1 and/or AKT1 co-expression in tobacco mesophyll protoplasts. When expressed alone, AtKC1 did not change the plasma membrane conductance: AtKC1-expressing protoplasts displayed the same current-pattern as control protoplasts transformed with the empty vector, *i.e.*, low currents with weak dependence on time and voltage ("current-pattern #1", Fig. 2A). In the same conditions, as previously reported (21), AKT1 expressed alone formed functional channels enabling large, time- and voltage-dependent currents to flow through the protoplast membrane upon hyperpolarisation, characterized by a threshold voltage close to -40 mV ("current-pattern #2", Fig. 2B, top). A variable feature displayed by the corresponding protoplasts was the current amplitude, probably due to differences in AKT1 expression level from one transformed protoplast to another.

All the protoplasts expressing both AtKC1 and AKT1 displayed time- and voltage-dependent currents but, in most cases, the activation voltage threshold of these currents was more negative than in pattern #2. This voltage-threshold was obtained as follows. In each AtKC1/AKT1 co-expressing protoplast and for each imposed voltage, it was checked whether the recorded current was significantly larger than the endogenous current recorded in control protoplasts at the same voltage. Stepping from 0 mV with a -20 mV decrement, the first voltage step for which this occurred was taken as the threshold for activation of the exogenous current. Activation voltage-thresholds were thus estimated to within 20 mV and, with respect to this, AtKC1/AKT1 co-expressing protoplasts could be sorted in three categories only (denoted current patterns #2, #3 and #4), corresponding to

threshold values of -40 (Figure 2B), -100 (Figure 2C) and -160 mV (Figure 2D) respectively.

### 3 AtKC1 subunits influence the gating of heteromeric channels

4 Average current-voltage curves for the different types of current patterns are shown  
5 in Figure 2D. Currents were recorded down to -240 mV or -260 mV in protoplasts  
6 displaying patterns #3 or #4, respectively. The voltage-gating parameters of these currents  
7 (Table 1) were derived by analyzing the tail currents according to a Boltzmann  
8 formalism (12). The resulting half-activation voltages, close to -90, -160 and -210 mV for  
9 current patterns #2, #3 and #4, respectively, highlight the differences in gating properties  
10 between these patterns. The average gating curves are shown in the inset of Figure 2E.

11 As a consequence of these drastic changes in gating parameters, no outward time-  
12 dependent K<sup>+</sup> currents were recorded, in 1 mM external K<sup>+</sup>, in AtKC1/AKT1 co-  
13 transformed protoplasts displaying current patterns #3 or #4 (Fig. 2F), while such outward  
14 currents were recorded in the AKT1 transformed protoplasts (Fig. 2G).

15 Depending on which subunits were expressed, the occurrence of the current patterns  
16 #1 to #4 varied as summarized in Figure 3. AtKC1- and AKT1-expressing protoplasts  
17 displayed a single current-pattern, current-pattern #1 and #2, respectively. Thus, none of  
18 the AtKC1-expressing protoplasts displayed time- and voltage-dependent currents and all  
19 the AKT1-expressing protoplasts displayed such currents below a threshold in the -40 mV  
20 range. AtKC1/AKT1 co-expressing protoplasts displayed one of the #2, #3 and #4 current-  
21 patterns, the first one being the less frequently observed (Figure 3).

22 We also investigated whether AtKC1 was able to interact with, and to change the  
23 channel activity of, another Kv subunit than AKT1. KAT1 has been found to interact with  
24 the C-terminal part of AtKC1 in two-hybrid experiments (personal communication by Dr. I.  
25 Chérel). Therefore, KAT1 was co-expressed with AtKC1 in tobacco protoplasts and the  
26 resulting heterologous channel activity was compared with the one resulting from the  
27 expression in the same context of KAT1 alone. The results, which are displayed as  
28 Supporting information on the PNAS website, indicate that AtKC1 and KAT1 subunits are  
29 able to form heteromeric channels with negatively shifted activation voltages when  
30 compared to homomeric KAT1 channels.

## 3.1 DISCUSSION

### 3.2 AtKC1 conditional targeting

33 GFP-tagging experiments such as those illustrated in Figure 1 may yield unexpected  
34 results. For example, the KAT1::GFP fusion was hardly seen on the plasma membrane of  
35 tobacco protoplasts (21) while KAT1 currents could reproducibly be recorded in the same  
36 expression system (Supporting Fig. 5; (21, 22)). Regarding AtKC1, however, the absence

of fluorescence localized to the plasma membrane in AtKC1::GFP-expressing tobacco mesophyll protoplasts and the cytoplasmic reticular pattern of GFP distribution (Fig. 1A) matched the systematic absence of exogenous current in *AtKC1*-expressing protoplasts (Figs. 2A and 2E, Table 1). As it has already been reported that the expression of *AtKC1* alone failed to yield exogenous current in *Xenopus* oocytes and COS cells (19), and (personal communication by Dr. E. Michard, respectively) one may assume that retention in the ER of this subunit makes it unable to form functional channels in the plasma membrane. That co-expression of AKT1 was able to drive AtKC1::GFP to the membrane (Fig. 1C) and that patch-clamped protoplasts co-expressing AtKC1 and AKT1 generally displayed currents different from AKT1 ones (Fig. 2B-E, Table 1) demonstrated that the two Kv subunits co-assemble into heteromeric channels with gating properties different from those of homomeric AKT1 channels. A comparable situation may be found in plant species other than *Arabidopsis*. For example, KDC1, a carrot homologue of AtKC1 has been shown to form heteromeric channels with DKT1, a carrot homologue of AKT1, when both subunits are co-expressed in *Xenopus* oocytes (23)).

The mechanism by which the interaction of AKT1 with AtKC1 may enable the latter polypeptide to be targeted to the plasma membrane is unknown. Tests of protein-protein interactions in the double hybrid system have shown that AtKC1 is not able to interact with itself while it is with AKT1 (24). One can propose that AtKC1 is unable to form homodimers and hence homo-tetramers, so that it remains, when expressed alone, under its monomeric form. The AtKC1 monomer could be retained in the ER possibly because it bears some special retention signal. AtKC1 subunits would have no such grounds for remaining in the ER when associated to Kv subunits of another type (AKT1, Figs. 1 and 2, and, possibly, KAT1, Supporting Fig. 5) within hetero-tetramers.

### Different types of AtKC1-AKT1 heteromers

Shaker subunits first assemble in dimers and Shaker channels are consequently formed by the association of two dimers (25, 26). If AtKC1 is unable to interact with itself, no AtKC1 dimers but only AKT1-AKT1 and AtKC1-AKT1 ones will be available for channel assembly in cells expressing both *AtKC1* and *AKT1*. Then, such cells (protoplasts) will have tetrameric channels incorporating from zero to two AtKC1 subunits as sketched in the three upper rows on Figure 4A. As recalled in the fourth row of this figure, homomeric AKT1 channels have a -40 mV activation voltage. Since incorporation of AtKC1 subunits in heteromeric channels produces a negative shift of the activation voltage (Fig. 2), it is reasonable to assume that heteromers with two AtKC1 subunits have more shifted activation voltages than those with a single AtKC1 subunit (for example <-160 and <-100 mV respectively as proposed in Fig. 4A and discussed below).

Regarding the present macroscopic current data (Figs 2 and 3, Table 1), a point of debate is that they have to be interpreted in terms of individual channel properties. In protoplasts expressing *AKT1* as the sole heterologous gene, one can assume that a

homogenous inward K<sup>+</sup> channel population was found. This probably underlies current-pattern #2 displayed by such protoplasts. On the contrary, the macroscopic currents recorded in protoplasts expressing both the *AtKC1* and *AKT1* genes resulted *a priori* from the summed contributions of a large number of channels of the three types figured in Figure 4A. The fact that those co-transformed protoplasts displayed different current patterns (Fig. 3) suggested, however, that the relative expression of the *AKT1* and *AtKC1* genes was not controlled in our conditions. A variable expression of the latter, for example, may have resulted in different populations of *AtKC1*-*AKT1* hetero-tetramers. To evaluate this hypothesis, the respective amount (in percent of the whole tetramer population) of each channel type obtained in *AtKC1*/*AKT1* co-expressing protoplasts was computed as a function of a variable *AtKC1* expression level, assuming that dimers were formed randomly and that tetramers then assembled randomly from those dimers. This computation was made considering three alternatives regarding the interactions between subunits within a dimer. Firstly, *AKT1* has the same affinity for *AtKC1* as for itself. This was simulated by considering that *AKT1*-*AtKC1* dimers were as stable as *AKT1*-*AKT1* dimers (no preference for homo- or hetero-dimerisation, *i.e.*, (purely) random, Fig. 4B). In the second alternative, *AKT1*-*AKT1* dimers were considered to be three times more stable than *AKT1*-*AtKC1* dimers (*i.e.*, preference for homo-dimerisation, Fig. 4C). In the third alternative, *AtKC1*-*AKT1* dimers were considered to be three times more stable than *AKT1*-*AKT1* dimers (*i.e.*, preference for hetero-dimerisation, Fig. 4D).

The results show that the proportion of homomeric *AKT1* channels decreases from 100% (if only *AKT1* is expressed) to a minimum, which is in the 16% range for a purely random channel assembly (Fig. 4B), in the 25% range in the case of a preference for homodimers (Fig. 4C) and down to the 2% range in the case of a preference for heterodimers (Fig. 4D). As discussed above, a current-pattern #3 can be observed only if homomeric *AKT1* channels are absent or so scarce that the membrane conductance remains negligible down to -100 mV. The dashed line in Figures 4B-D marks a 10% threshold, below which the proportion of homomeric *AKT1* channels must fall to rank a *AtKC1*/*AKT1* co-expressing protoplast in the current-pattern #3 category. This dashed line is not crossed either in the "random assembly" case or in the "preference for homodimers" one. It is only crossed in the "preference for heterodimers" case, when the *AtKC1* expression level reaches the 60% range. Hence, it is predicted that only current-pattern #2 would be displayed by *AtKC1*/*AKT1* co-expressing protoplasts in the two former cases (see labels and double arrows above the curves in Fig. 4B-C). Moreover, observation of current pattern #4 is predicted in the "preference for heterodimers" case only, when the *AtKC1* expression level reaches the 85% range.

From these computations it can be concluded that a purely random assembly scheme (Fig. 4B) cannot match the observed diversity in current patterns (Fig. 3) even when considering a highly variable expression level of *AtKC1*. The same holds for a

/random assembly scheme including a preference for homodimers (Fig. 4C). Thus, only a  
 2random assembly scheme including a preference for heterodimers (Fig. 4D) matches the  
 3observed data (Fig. 3).

4 Preference for AtKC1-AKT1 dimers over AKT1-AKT1 dimers favors the inward-  
 5channel regulatory role of AtKC1 expression in plant cells (see below). Similar findings  
 6have recently been reported regarding the carrot Shaker subunit KDC1, an orthologue of  
 7AtKC1 (27), which forms preferably heterodimers when co-expressed with other Shaker  
 8subunits (this has been elegantly demonstrated by comparing the properties of channels  
 9resulting from the co-expression of KAT1 and KDC1 and from the expression of KAT1-  
 10KDC1 tandems). The activation potential of KDC1-KAT1 heteromers is shifted negatively  
 //with respect to the activation potential of KAT1 homomers (27).

## 12AtKC1-KAT1 heteromers

13The regulatory activity of AtKC1 is unlikely to be restricted to its interaction with AKT1.  
 14Indeed, several sets of data indicate that functional interactions can also occur with other  
 15Shaker channel subunits. The expression pattern of AtKC1 in the plant is rather wide-  
 16spread and overlaps clearly with that of several Shaker channel subunits, such as KAT1 in  
 17etiolated hypocotyls (data not shown and (28)) and AKT2 in leaf epidermis (24). Two-  
 18hybrid experiments in yeast indicate that, besides AKT1 (24), several members of the  
 19Shaker family can physically interact with AtKC1: at least KAT1 (data not shown) and  
 20AKT2 (24). Co-expression of AtKC1 and KAT1 in tobacco mesophyll protoplasts  
 21evidenced a functional interaction between these two Kv alpha-subunits (Fig. 5 in  
 22Supporting information). AtKC1 was found to induce a strong shift of the activation  
 23threshold of the inward currents towards a more negative value from ca. -120 mV (KAT1  
 24expressed alone) to -180 mV (Fig. 5), as it did in AtKC1/AKT1 co-transformed protoplasts  
 25displaying current-pattern #3 (see Fig. 2C). Some AtKC1/KAT1 co-transformed protoplasts  
 26displayed no time- or voltage-dependent current in the whole voltage range that could be  
 27explored (down to -220 or -240mV): although GFP staining assessed a successful  
 28transformation, those protoplasts had the same current pattern as untransformed ones.  
 29This situation contrasted with AtKC1/AKT1 co-transformed protoplasts, which always  
 30displayed currents different from control protoplasts (current-pattern #1 in Fig. 2A). It can  
 31be assumed that these protoplasts had AtKC1-KAT1 heteromeric channels with an  
 32activation voltage so negatively shifted that they failed to be activated in our experimental  
 33conditions: in those protoplasts, it is likely that, when high enough, the expression of  
 34AtKC1 subunit completely suppressed the activity of KAT1 (in a physiological voltage  
 35range).

## 36Physiological role of AtKC1

37The fact that co-expression of AtKC1 with other plant Shaker genes was found to  
 38negatively shift the activation voltage of the heteromeric channels AtKC1 participated in, is

1 consistent with previously reported observations in *Arabidopsis* root hairs (20). It has been  
 2 shown that absence of *AtKC1* expression results in a shift towards more positive values of  
 3 the activation voltage of the major membrane inward K<sup>+</sup> conductance (20), which depends  
 4 on *AKT1* expression (29).

5 At the cellular level, the most obvious consequence of *AKT1* regulation by *AtKC1* is a  
 6 strong reduction in the inward K<sup>+</sup> current. Another consequence was revealed by patch-  
 7 clamp experiments in bath solutions containing 1 mM K<sup>+</sup>, a physiological concentration.  
 8 With 100 mM K<sup>+</sup> in the pipette solution, the K<sup>+</sup> equilibrium potential ( $E_K$ ) was close to  
 9 -120 mV. At membrane potential values between the activation threshold of *AKT1* and  $E_K$   
 10 (e.g., at -80 or -100 mV), significant outward currents could be recorded in protoplasts  
 11 expressing *AKT1* alone, while in the same conditions, no outward currents were recorded  
 12 in protoplasts co-expressing *AKT1* and *AtKC1* (see Fig. 2F). Thus, the shift in activation  
 13 threshold towards more negative values upon co-expression of *AtKC1* could allow the cell  
 14 to regulate its membrane inward K<sup>+</sup> conductance in response to changes in external K<sup>+</sup>  
 15 concentrations, thereby preventing *AKT1* from mediating K<sup>+</sup> efflux. In other words,  
 16 regulation of *AKT1* by *AtKC1* could decrease K<sup>+</sup> influx or prevent K<sup>+</sup> efflux, depending on  
 17 the membrane potential and the external concentration of K<sup>+</sup>.

18 In conclusion, *AtKC1* can be considered as a silent alpha subunit of plant Shaker  
 19 channels, acting as a negative regulator of other Shaker alpha subunits such as *KAT1* and  
 20 *AKT1*. It is worth noting that the *AKT1* gene shows little transcriptional regulation upon  
 21 several changes in bulk ionic conditions such as soil K<sup>+</sup> availability and salt stress. In the  
 22 latter case, while *AKT1* expression remained unchanged, *AtKC1* expression has been  
 23 shown to dramatically increase in leaves and especially in hydathodes (24), a cell type  
 24 which also expresses *AKT1*. Thus, down-regulation of the activity of the *AKT1* gene  
 25 product by *AtKC1* may help the plant in facing salt stress.

## 26 ACKNOWLEDGEMENTS

27 E. H. was granted by INRA and Région Languedoc-Roussillon. G. D. was recipient of an  
 28 European Marie Curie Fellowship. C.A. was supported by the "ToxNuc-E" French research  
 29 programme. Drs. Benoît Lacombe, Isabel A. Lefevre and Michel Vivaudou made useful  
 30 comments on the manuscript.

## 31 REFERENCES

- 32 1. Véry, A.-A. & Sentenac, H. (2003) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **54**, 575-  
     33 603.
- 34 2. Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1987) *Science*  
     35 **237**, 749-753.

13. Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A.,  
 2 Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stühmer, W., et al. (2005) *Pharmacol.*  
 3 *Rev.* **57**, 473-508.
44. Hugnot, J.-P., Salinas, M., Lesage, F., Guillemaire, E., de Weille, J., Heurteaux, C.,  
 5 Mattéi, M. G. & Lazdunski, M. (1996) *EMBO J.* **15**, 3322-3321.
65. Post, M. A., Kirsch, G. E. & Brown, A. M. (1996) *FEBS Lett.* **399**, 177-182.
76. Salinas, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Hugnot, J.-P. & Lazdunski, M. (1997) *J. Biol.*  
 8 *Chem.* **272**, 24371-24379.
97. Ottschyttsch, N., Raes, A., Van Hoorick, D. & Snyders, D. J. (2002) *Proc. Natl. Acad.*  
 10 *Sci. U.S.A.* **99**, 7986-7991.
118. Patel, A. J., Lazdunski, M. & Honoré, E. (1997) *EMBO J.* **16**, 6615-6625.
129. Kerschensteiner, D., Monje, F. & Stocker, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 18154-18161.
1310. Vega-Saenz de Miera, E. C. (2004) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **123**, 91-103.
1411. Pilot, G., Pratelli, R., Gaymard, F., Meyer, Y. & Sentenac, H. (2003) *J. Mol. Evol.* **56**,  
 15 418-434.
1612. Véry, A.-A., Gaymard, F., Bosseux, C., Sentenac, H. & Thibaud, J.-B. (1995) *Plant J.*  
 17 **7**, 321-332.
1813. Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Chérel, I., Boucherez, J., Thibaud, J.-B. &  
 19 Sentenac, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 3215-3221.
2014. Gaymard, F., Cerutti, M., Horeau, C., Lemaitre, G., Urbach, S., Ravallec, M.,  
 21 Devauchelle, G., Sentenac, H. & Thibaud, J.-B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 22863-  
 22 22870.
2315. Mouline, K., Véry, A.-A., Gaymard, F., Boucherez, J., Pilot, G., Devic, M., Bouchez, D.,  
 24 Thibaud, J.-B. & Sentenac, H. (2002) *Genes Dev.* **16**, 339-350.
2516. Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H. & Thibaud, J.-B.  
 26 (2000) *Plant Cell* **12**, 837-851.
2717. Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Porée, F., Boucherez, J.,  
 28 J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Véry, A.-A., et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*  
 29 **100**, 5549-5554.
3018. Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J.,  
 31 Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J.-B. & Sentenac, H. (1998) *Cell* **94**, 647-655.
3219. Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Müller-Röber, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, G.,  
 33 & Hedrich, R. (1997) *Biophys. J.* **72**, 2143-2150.
3420. Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K. &  
 35 Hedrich, R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 4079-4084.
3621. Hosy, E., Duby, G., Véry, A.-A., Costa, A., Sentenac, H. & Thibaud, J.-B. (2005) *Plant*  
 37 *Methods* **1**, 14.
3822. Li, L., He, Z., Pandey, G. K., Tsuchiya, T. & Luan, S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 5360-  
 39 5368.
4023. Formentin, E., Varotto, S., Costa, A., Downey, P., Bregante, M., Naso, A., Picco, C.,  
 41 Gambale, F. & Lo Schiavo, F. (2004) *FEBS Lett.* **573**, 61-67.
4224. Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Chérel, I. & Sentenac, H. (2003) *Plant Mol. Biol.*  
 43 **51**, 773-787.
4425. Tu, L. & Deutsch, C. (1999) *Biophys. J.* **76**, 2004-2017.
4526. Urbach, S., Chérel, I., Sentenac, H. & Gaymard, F. (2000) *Plant J.* **23**, 527-538.
4627. Naso, A., Montisci, R., Gambale, F. & Picco, C. (2006) *Biophys. J.* **91**, 3673-3683.

28. Philipp, K., Ivashikina, N., Ache, P., Christian, M., Luthen, H., Palme, K. & Hedrich,  
R. (2004) *Plant J.* **37**, 815-827.
29. Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P. & Sussman, M. R. (1998) *Science* **280**,  
918-921.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1 : Conditional targeting of the Shaker subunit AtKC1 to the plasma membrane upon interaction with AKT1.**

A-C Subcellular localization of AtKC1::GFP (A), of AKT1::GFP (B) and of AtKC1::GFP co-expressed with AKT1 (C). The left panels display protoplast sections analyzed for GFP fluorescence, the middle panels the same sections analyzed for chloroplast autofluorescence and FM4-64 fluorescence (not in A) and the right panels show the overlay of left and middle panels on the corresponding transmission light photographs. Scale bars, 20 µm.

**Fig. 2 : Properties of macroscopic currents recorded in protoplasts expressing AKT1 or AtKC1 or both.**

A-D, Typical recordings obtained with the patch-clamp technique applied to tobacco mesophyll protoplasts expressing GFP alone ("control"; n = 24), or GFP and AtKC1 ("AtKC1", n = 14), AKT1 ("AKT1", n=16) or both AtKC1 and AKT1 ("AtKC1+AKT1", n = 25). The macroscopic inward current flowing through the membrane was recorded in a bath solution containing 50 mM K<sup>+</sup>. Four typical current patterns could be distinguished. A, Current-pattern #1: instantaneously activating currents of very low amplitude, systematically recorded only in "control" or "AtKC1" protoplasts. B, Current-pattern #2: large slowly activating currents with an activation voltage close to -40 mV, typically recorded in "AKT1" protoplasts (upper trace) and some "AtKC1/AKT1" protoplasts (lower trace). C and D, Current-patterns #3 and #4: slowly activating currents with an activation voltage close to -100 mV (C) or to -160 mV (D) recorded in "AtKC1/AKT1" protoplasts only.

E, Current-voltage curves (means ± SE) corresponding to the four current patterns illustrated in A-D. The data obtained from all the protoplasts displaying a given current pattern were pooled. Current-pattern #1, n = 38 (24 "control" protoplasts + 14 "AtKC1" protoplasts). Current-pattern #2: n = 19 (16 "AKT1" protoplasts + 3 "AtKC1/AKT1" protoplasts). Current-patterns #3 and #4: n = 14 and 8 "AtKC1/AKT1" protoplasts, respectively. In insert, G/Gmax values, obtained by fitting the tail currents with the Boltzmann equation, are plotted against voltage. Symbols and solid line represent experimental data (mean ± SE) and fit results (see parameters in Table 1), respectively.

F-G, AtKC1 subunit can suppress outward currents in low K<sup>+</sup> concentration. Typical current recordings on "AtKC1/AKT1" (F) and "AKT1" (G) transformed protoplasts in a 1mM K<sup>+</sup> bath solution with a 100mM K<sup>+</sup> pipette solution. Outward currents are recorded in G but not in F at voltages positive to E<sub>K</sub>≈-118 mV.

**Fig 3. Current pattern prevalence depends on AtKC1 and AKT1 expression levels.**

Histograms represent in percentage the number of times a given current pattern was observed in 14 "AtKC1" protoplasts, 16 "AKT1" protoplasts and 25 "AtKC1/AKT1" protoplasts (see Fig. 2).

**Fig. 4. Model of tetrameric channel assembly in protoplasts expressing both AtKC1 and AKT1.**

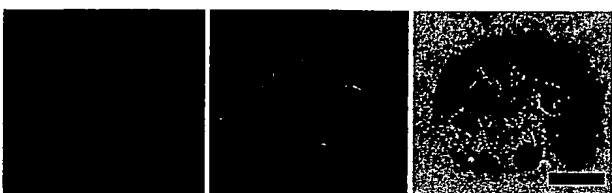
The first step in channel formation is the assembly of two subunits in dimers. AKT1 (white dot) can form homo-dimers, while AtKC1 (black dot) cannot. AKT1-AtKC1 heterodimers can be formed. The two types of possible dimers can form three types of heterotetramers containing from zero to two AtKC1 subunits. It is proposed that these types of hetero-tetramers activate below a voltage threshold in the -40, -100 and -160 mV range, respectively.

Predictions regarding the distribution, among the three expected types, of the channels assembled in AtKC1-AKT1 co-transformed protoplasts (see A). The frequency of each of these three tetramer types was expressed as a function of a putatively variable AtKC1 expression level expressed as a percentage of the AKT1 expression level. The pairing of subunits to form dimers was assumed to be a random process. Three alternatives were considered regarding the fate of the obtained dimers. First, all the formed dimers were kept available for subsequent tetramer assembly (except AtKC1 dimers, which were discarded; B, "random assembly"). Second, formed AKT1 homodimers were kept available for subsequent tetramer assembly with a probability three times higher than AtKC1-AKT1 heterodimers (discarded dimers yielded monomers for new pairing; C, "preference for homodimers"). The third considered alternative was the reverse of the second one: formed AtKC1-AKT1 heterodimers were kept available for subsequent tetramer assembly with a probability three times higher than AKT1 homodimers (D, "preference for homodimers"). In each of the three above alternatives, pairing of dimers to form tetramers was considered to be purely random. The horizontal dotted line marks the threshold below which the frequency of a given type of channel should fall so that it did not influence the macroscopic current pattern of the protoplast (see text). The two vertical lines in D mark the relative AtKC1 expression levels corresponding to the transition from current-pattern #2 to current-pattern #3 and the one from current-pattern #3 to current-pattern #4 (see text).

**Table 1. Gating parameters of exogenous currents recorded in transformed tobacco mesophyll protoplasts.**

expressed Kv subunit(s)	gating parameter			n	current pattern
	Ea estimate (mV)	Ea50 mean ± SD (mV)	z mean ± SD		
AtKC1	n.d.	n.d.	n.d.	11	#1
AKT1	-40	-94 ± 10	1.34 ± 0.24	5	#2
AtKC1/AKT1	-40	-83 ± 2	1.37 ± 0.14	2	#2
AtKC1/AKT1	-100	-158 ± 4	1.16 ± 0.06	13	#3
AtKC1/AKT1	-160	-210 ± 6	1.34 ± 0.11	3	#4

**A. AtKC1::GFP**



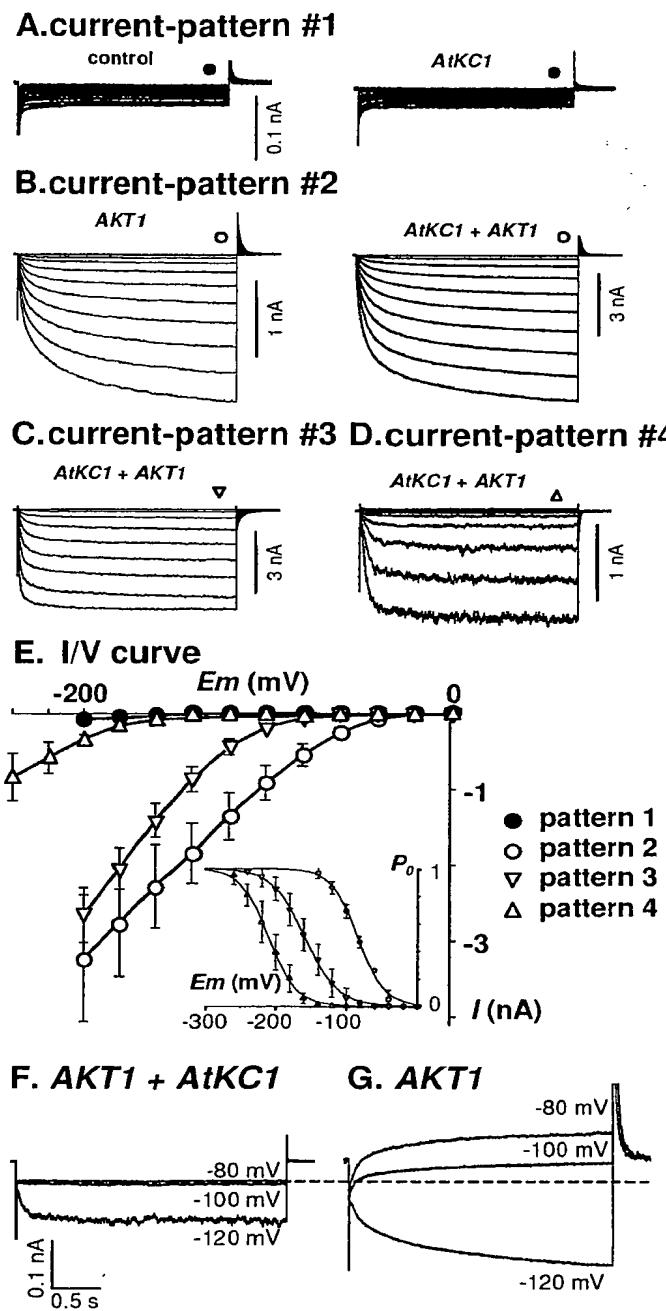
**B. AKT1::GFP**

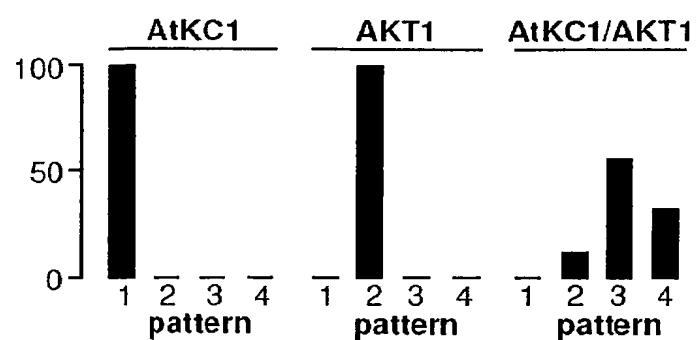


**C. AtKC1::GFP + AKT1**

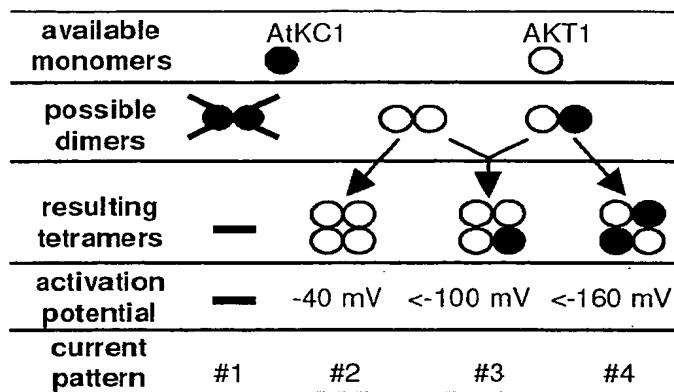
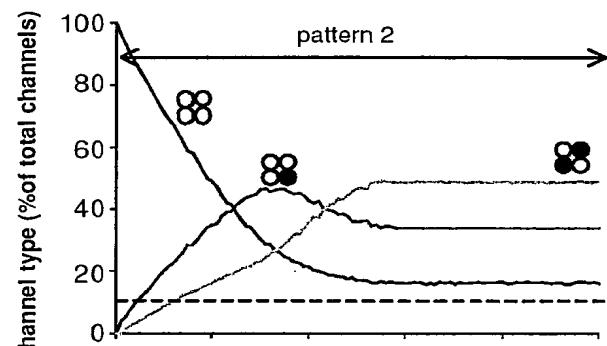
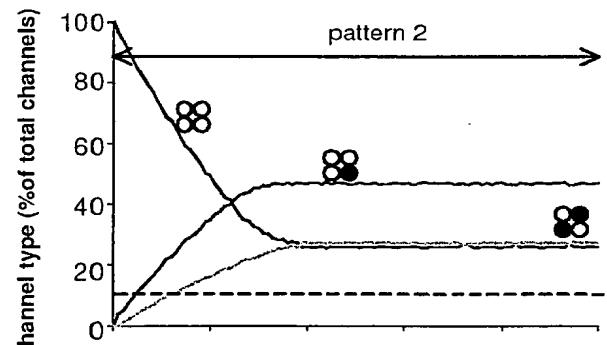
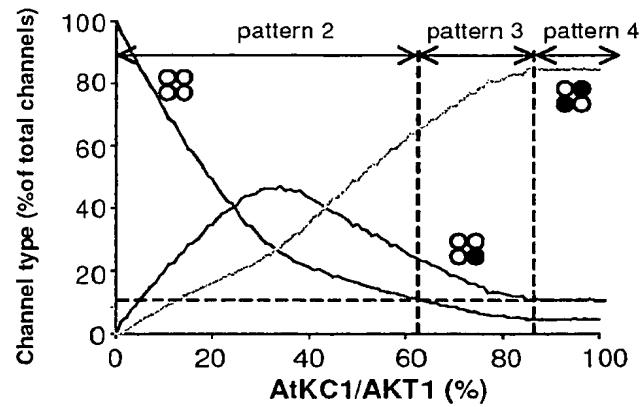


**FIGURE 1**

**FIGURE 2**



**FIGURE 3**

**A. Hetero-tetramerisation scheme****B. Random assembly****C. Preference for homodimers****D. Preference for heterodimers****FIGURE 4**

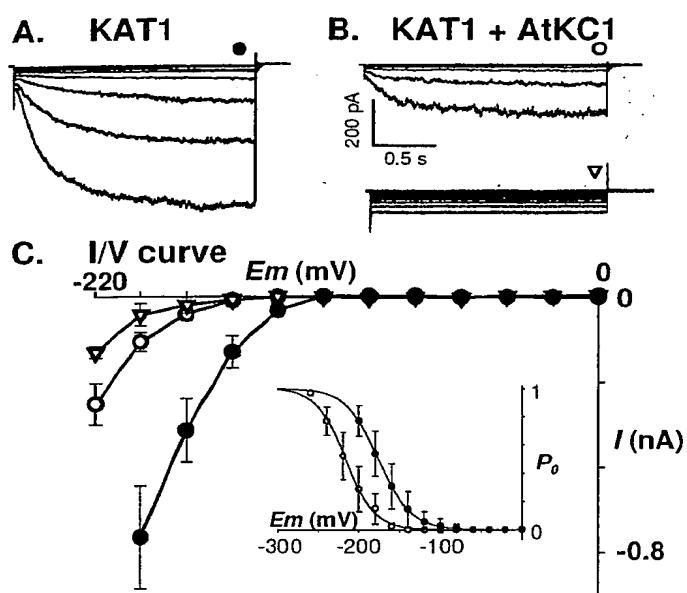
**Supporting Information (to make available on the PNAS website)**

When KAT1 was expressed alone, typical time- and voltage-dependent inward currents were recorded that activated below a -120 mV threshold (Supporting Fig. 5A). When KAT1 and AtKC1 were co-expressed, most of protoplasts displayed a similar current-pattern but with a more negative activation threshold (close to -180 mV, Supporting Fig. 5B, upper current trace). Some *AtKC1/KAT1* co-transformed protoplasts showed much smaller currents (Supporting Fig. 5B, lower current trace) or even an absence of current, at least in the voltage range that could be explored on mesophyll tobacco protoplasts. Average current values, sampled at the steady-state and plotted against voltage, and relative conductance values, derived from the analysis of tail currents, show that differences between KAT1 and AtKC1-KAT1 currents are clearly due to an alteration of the voltage-gating (Supporting Fig. 5C). The corresponding half-activation voltage was shifted from  $-175 \pm 3$  mV ( $n = 12$ ) to a value more negative than -250 mV (currents recorded down to -260 mV yielding an estimate of  $-256 \pm 20$  mV;  $n = 4$ ).

**Supporting Fig. 5. AtKC1 subunit interacts with KAT1.**

**A and B** Typical recordings obtained with the patch-clamp technique applied to tobacco mesophyll protoplasts expressing *GFP* and *KAT1* ("KAT1",  $n = 13$ , A), or *GFP* and both *AtKC1* and *KAT1* ("AtKC1/KAT1",  $n = 11$ , B). A, delayed voltage-dependent currents with an activation voltage ( $E_a$ ) close to -120 mV were recorded in all "KAT1" protoplasts ( $n=13$ ). B, delayed voltage dependent currents with a -180 mV  $E_a$  were recorded in 7 (of 11) "AtKC1/KAT1" protoplasts (top trace), while a flat current pattern was displayed by 4 (of 11) "AtKC1/KAT1" protoplasts (bottom trace). The voltage-clamp protocol stepped from -60 mV to -200 mV (A) and from -60 mV to from -220 mV (B).

**C**, Current-voltage curves (means  $\pm$  SE) corresponding to the three current patterns illustrated in A-B. The data obtained from all the protoplasts displaying a given current pattern were pooled. Symbols are cross-referenced to data shown in A and B. In insert, G/Gmax values, obtained by fitting the tail currents with the Boltzmann equation, are plotted against voltage. Symbols and solid line represent experimental data (mean  $\pm$  SE) and fit results, respectively.



SUPPORTING FIGURE 5

### **III.4.- Caractérisation d'un nouveau canal potassique Shaker exprimé dans la baie de raisin.**

#### **III.4.1.- Présentation de l'article 4**

Les travaux entrepris sur *Arabidopsis* ne sauraient suffire au nécessaire développement des connaissances portant sur les mécanismes du développement des fruits et de leur maturation, questions d'une importance économique majeure. Pour cette raison nous avons cherché à transférer en les adaptant, les acquis en termes de techniques expérimentales et de connaissances, de la plante-modèle à une espèce d'intérêt agronomique, elle-même considérée comme un modèle pour l'étude du développement des fruits non-climactériques : la vigne.

Au démarrage de cette opération, les données expérimentales disponibles indiquent que les canaux Shaker des plantes sont impliqués dans les échanges de K<sup>+</sup> à l'échelle cellulaire (influx/efflux) ainsi qu'à l'échelle de la plante entière (charge et décharge de la sève dans les réseaux xylémien et phloémien). Leur implication dans ces transports est directe, en ce qui concerne le potassium lui-même, et indirecte (par couplage électrique), en ce qui concerne les autres composés nutritifs, comme les éléments minéraux et les métabolites. En particulier, les canaux Shaker sont probablement impliqués dans la décharge des sèves au niveau des organes puits. En tant que fruit, la baie de raisin constitue un modèle de puits et c'est pour cette raison qu'en dépit de son orientation agronomique, l'opération de recherche décrite dans cette section du mémoire s'inscrit naturellement dans le programme scientifique de l'équipe centré sur l'étude des canaux ioniques en général et des canaux K<sup>+</sup> de type Shaker en particulier.

Comme dans tous les tissus végétaux, le potassium est le principal agent de la neutralisation des charges négatives des acides organiques accumulés dans la baie de raisin. K<sup>+</sup> participe de ce fait au contrôle du pH et de l'équilibre acido-basique de la pulpe (Possner and Kliewer, 1985; Coombe, 1987; Iland and Coombe, 1988). Un petit nombre de plantes, parmi lesquelles la vigne, ont la particularité d'accumuler de l'acide tartrique (Champagnol, 1984). La synthèse de l'acide tartrique intervient aux stades précoces du développement des baies (ou des feuilles). Son métabolisme ultérieur est relativement lent et son niveau d'accumulation reste assez stable jusqu'à la maturité. L'acide malique, au contraire, connaît une rapide et forte accumulation jusqu'à l'initiation de la phase de mûrissement, puis diminue jusqu'à la maturité des baies pendant que les sucres deviennent l'osmoticum majeur. Un large ensemble de données agronomiques et physiologiques révèle que l'accumulation du potassium dans la baie est négativement corrélée avec l'acidité et la valeur œnologique du moût (Champagnol, 1984). En effet, une alimentation potassique excessive entraîne une augmentation de l'accumulation de malate pendant les premières phases de développement de la baie menant à un excès relatif de malate qui persiste jusqu'à la maturité. D'autre part, une forte teneur du moût en K<sup>+</sup> favorise la précipitation de bitartrate de potassium. Il résulte de ces deux phénomènes que le rapport malate / tartrate est significativement augmenté dans les moûts obtenus à partir de raisins suralimentés en K<sup>+</sup>. L'augmentation de ce rapport est un inconvénient à deux titres.

Tout d'abord, parce que le tartrate est un facteur de qualité œnologique dans la mesure où il apporte, après les deux fermentations (alcoolique et malo-lactique), l'essentiel de l'acidité qui est un paramètre important de l'équilibre gustatif du vin. Ensuite, la présence d'un excès de malate dans le moût est à éviter car ce substrat de la fermentation malo-lactique entraîne un développement bactérien dans le vin qui est inopportun s'il se produit après la mise en bouteille. Des traitements œnologiques correctifs existent pour pallier ces difficultés : ajout d'acide tartrique, recours à des fermentations lactiques biotechnologiques pour garantir une fermentation malo-lactique complète avant la mise en bouteille. Cependant ces procédés sont artificiels, onéreux et la législation tend à en restreindre l'emploi.

La compréhension des mécanismes d'entrée et de distribution du potassium dans la baie de raisin pourrait permettre de définir les conditions d'une meilleure maîtrise des teneurs en K<sup>+</sup> de la baie et de l'acidité des moûts, et donc d'une amélioration à moindre coût de la qualité organoleptique du vin.

Le criblage d'une banque génomique de *Vitis vinifera* à l'aide de sondes provenant d'*Arabidopsis thaliana* (travail de Réjane Pratelli dans l'équipe, thèse soutenue en 2000) a permis d'isoler la séquence d'un canal nommé SIRK, orthologue du canal potassique Shaker KAT2 (Pilot et al., 2001). L'étude de plants de vigne transgéniques exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur SIRK a permis de localiser l'expression du canal SIRK dans les cellules de garde et dans le xylème (Pratelli et al., 2002).

Le criblage d'une banque d'ESTs de *Vitis vinifera* avec une sonde préparée à partir de l'ADNc SKOR (canal sortant d'*Arabidopsis* (Gaymard et al., 1998) a conduit à l'identification d'un autre canal. Celui-ci, nommé VvSOR (pour *Vitis vinifera Shaker Outward Rectifier*), est exprimé dans toutes les parties aériennes de la plante, et sa caractérisation électrophysiologique l'identifie comme un canal sortant régulé, notamment, par le pH intracellulaire et par la concentration extracellulaire de K<sup>+</sup>. En collaboration avec Laurent Torregrossa, Réjane Pratelli avait entrepris de surexprimer VvSOR (transgène sous contrôle du promoteur 35S) dans des plants de vigne transgéniques afin de déterminer le rôle de ces canaux Shaker sortants dans la physiologie de la plante, et plus particulièrement dans le développement de la baie de raisin.

En collaboration avec Charles Romieu, j'ai réalisé l'étude des deux premières fructifications (été 2003 et printemps 2004) de ces transformants. Le résultat de ces observations est présenté, ainsi que les étapes antérieures du travail sur VvSOR.

# Identification and characterization of a Shaker-like outwardly rectifying potassium channel expressed in grapevine berries

Réjane Pratelli<sup>(1)</sup>, Eric Hosy<sup>(1)</sup>, Benoît Lacombe<sup>(1)</sup>, Laurent Torregrosa<sup>(2)</sup>, Charles Romieu<sup>(2)</sup>, Agnès Ageorges<sup>(3)</sup>, Jean-Baptiste Thibaud<sup>(1\*)</sup> and Hervé Sentenac<sup>(1)</sup>

<sup>1</sup>Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, UMR 5004 Agro.M-CNRS-INRA-UM2, 1 place Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France.

<sup>2</sup>Biologie du Développement des Plantes Pérennes Cultivées, UMR 1098 Agro.M-CIRAD-INRA-IRD, 2 place Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France.

<sup>3</sup>Sciences pour l'Œnologie, UMR1083 Agro.M-INRA-UM1, 2 place Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France

(\*corresponding author; e-mail thibaud@ensam.inra.fr; telephone +33-(0)-499-612-609 ; fax +33-(0)-499-612-930.

The nucleotide sequence reported in the paper has been submitted to EMBL database with accession number AJ490336

## ABSTRACT

The amount of K<sup>+</sup> accumulated in the grapevine berry has been shown to strongly influence the composition and quantity of organic acids stored in this fruit. Searching for transport systems involved in K<sup>+</sup> loading of grape berries, we identified an outwardly rectifying Shaker K<sup>+</sup> channel that we named VvSOR. When expressed in *Xenopus* oocytes, VvSOR displays functional properties reminiscent of those of the two *Arabidopsis* outwardly-rectifying Shaker channels AtSKOR and AtGORK. VvSOR is expressed in aerial vegetative parts and also in the fruit. Taken together, the functional properties and expression pattern suggest that VvSOR is a grapevine counterpart of the *Arabidopsis* GORK channel, which is notably expressed in guard cells and involved in regulation of stomatal aperture. Analysis of VvSOR expression pattern during berry maturation suggests that this channel could also be involved in sustained wholesale K<sup>+</sup> transport into grape berries. Interestingly, VvSOR-overexpressing transgenic grapevines yielded larger berries with a higher tartrate/malate ratio.

**Key words:** potassium channel; *Vitis vinifera*; outward rectifier; grape berry.

## INTRODUCTION

In addition to its high economical importance (Dutruc-Rosset, 2003), grapevine provides a model for investigating adaptation to water stress, development of non-climacteric fruits and physiology of acidic fruits. The vacuolar pH of grape berry cells is estimated between 2.2 and 3.5 (Hrazdina et al., 1994), due to a large accumulation of tartaric and malic acids during the development of the fruit. K<sup>+</sup> being the most abundant cation in the cell, it is largely involved in the electrical neutralization of those organates. A large set of data has shown that an increase in the K<sup>+</sup> content (due to potassium fertilization or increase in K<sup>+</sup> uptake efficiency of the rootstock) leads to a modification of the accumulation pattern and of the relative concentrations

of organic acids in the berry (Hale, 1977). However, the relationships between K<sup>+</sup> accumulation and organic acid composition of the ripe berry are still poorly understood at the molecular level.

In order to understand at the molecular and cellular levels the determinants of K<sup>+</sup> fluxes in the fruit, we searched for potassium transporters expressed in that organ. Shaker-like channels identified in *Arabidopsis* have been shown to be involved in long-term wholesale fluxes of K<sup>+</sup> (Véry and Sentenac, 2003). Grapevine counterparts of these channels can therefore be expected to play important roles in the control of K<sup>+</sup> loading into the fruits. In a previous search for grapevine Shaker-like channels, we identified VvSIRK, an inwardly rectifying Shaker channel which displays developmental regulation in the berries (Pratelli et al., 2002). In a search for outwardly rectifying channels, we characterized VvSOR, a new Shaker-like potassium channel expressed in the berries. Here we notably show that VvSOR-overexpression in transgenic grapevines results in a significant increase in berry mean size and in the tartrate/malate ratio.

## RESULTS

### Cloning of a cDNA encoding a K<sup>+</sup> channel similar to SKOR-like channels

A grapevine berry cDNA library was screened with a probe prepared from the *Arabidopsis thaliana* outwardly-rectifying potassium channels *AtSKOR* and *AtKCO1* cDNAs (see Material and Methods). One positive phage was obtained. Sequencing the 2.4 kbp insert showed it consisted in an incomplete ORF, similar to SKOR. RACE experiments allowed to obtain a cDNA fragment containing the beginning of the ORF and about 150 additional bp corresponding to the 5'UTR region. The full-length cDNA (2.5 kbp) was named *VvSOR* (*Vitis vinifera* Shaker-like Outward Rectifier, EMBL database accession number: AJ490336).

*VvSOR* encodes a 796-amino acid polypeptide with a molecular weight of 91.2 kDa. *VvSOR* exhibits the typical structure of the plant Shaker channels (Fig. 1A), i.e. (i) a short N-terminal region, (ii) a hydrophobic core composed of 6 transmembrane segments (named S1 to S6) and a pore forming domain (P) between S5 and S6, (iii) a long C-terminal region containing a putative cyclic nucleotide binding domain, followed by an ankyrin domain consisting in six ankyrin repeats and a K<sub>HA</sub> domain, rich in hydrophobic and acidic amino acids (Zimmermann and Sentenac, 1999). Both the C- and the N-terminal regions of the plant Shaker channels are believed to be cytoplasmic. Compared to the inward channels *VvSIRK*, *AtKAT1* and *AtAKT1*, *VvSOR* contains 8 additional amino acids in the S5-P linker (Fig. 1B), which are also found (in a more or less conserved manner) in the outward channels *AtSKOR*, *AtGORK* and *PtORK* (Langer et al., 2002). This additional sequence in *VvSOR* is more similar to that of the *Arabidopsis* channels than to that of the poplar one, whereas the overall sequence similarity for P, S5 and S6 reaches 95% (Fig. 1B) for these 4 channels. It is also worthwhile noting that the S4 domains of *VvSOR* and *AtGORK* are almost identical (Fig. 1C).

At the whole protein level, *VvSOR* shares 74% identity with *AtSKOR* (Gaymard et al., 1998) and 68% with *AtGORK* (Ache et al., 2000). The comparison of the gene structures (i.e. intron positions) of *VvSOR*, *AtSKOR* and *AtGORK* showed, however, that the *Vitis* gene is more closely related to *AtGORK*, as the two genes possess common specific intron positions that cannot be found in the *AtSKOR* gene (Pilot et

al., 2003b). *VvSOR* is then likely to be the orthologous gene of *AtGORK* in grapevine.

### **Southern analysis of genes similar to *VvSOR* in *Vitis* genome**

Southern blots of leaf genomic DNA were performed using *VvSOR* cDNA as a probe (data not shown). The complexity of the banding pattern suggests that there is at least one other gene (possibly two) highly similar to *VvSOR* in the grapevine genome. Accordingly, an *AtSKOR*-like channel expressed in grapevine roots was recently identified by systematic sequencing of *Vitis* cDNA (Decroocq et al., 2003). Two *AtSKOR* paralogs have also been identified in rice (Pilot et al., 2003b).

### **Functional characterization in *Xenopus* oocytes**

*VvSOR* electrophysiological properties were analysed after injection of *VvSOR* cDNA (cloned in the pCI vector) in *Xenopus* oocytes. In pCI-*VvSOR* injected oocytes bathed in 10 mM K<sup>+</sup>, depolarization of the membrane beyond -60 mV elicited an outward current that was not recorded in control oocytes injected with empty vector (data not shown). The exogenous macroscopic current displayed sigmoidal activation (Fig. 2A). No inactivation could be observed even during depolarizing pulses lasting 50 s (not shown). Plotting the steady-state current against the voltage in different external K<sup>+</sup> conditions (10 or 100 mM) revealed a strong outward rectification (Fig. 2B) and a positive shift of the threshold activation potential towards the K<sup>+</sup> equilibrium potential ( $E_K$ ). The reversal potential of the *VvSOR* tail current ( $E_{rev}$ ) determined in these two different external K<sup>+</sup> concentrations was found to remain close to  $E_K$  (Fig. 2B, inset), indicating that the outward current mediated by *VvSOR* was mainly carried by K<sup>+</sup> ions.

Relative permeability ratios were calculated, as described (Lacombe and Thibaud, 1998), from  $E_{rev}$  values in different external solutions (not shown). *VvSOR* displays the following permeability sequence: K<sup>+</sup> > Rb<sup>+</sup> >> Na<sup>+</sup> ( $P_{Rb}/P_K=0.47\pm 0.03$ , n=4;  $P_{Na}/P_K=0.02\pm 0.003$ , n=5).

The patch-clamp technique (cell-attached configuration) was used to investigate single-channel properties of *VvSOR*. Fig. 3A shows an example of the most frequent single-channel activity recorded in membrane patches from *VvSOR*-injected oocytes, with 10 mM K<sup>+</sup> in the pipette (i.e., at the extracellular side of the membrane patch). This activity resulted only in outward currents and was observed only at potentials positive to ca. -60 mV. The sum of 150 current records obtained at +40 mV resulted in a pseudo macroscopic record that was clearly reminiscent of the macroscopic current trace recorded by the two-electrode voltage-clamp technique upon depolarization at +40 mV (Fig. 3B). Thus, the single-channel current shown in Fig. 3A was likely to be mediated by *VvSOR*. Analysis of the single-channel current-voltage relationship allowed determination of the single-channel slope conductance (Fig. 3C): 34 pS in 100 mM and 23 pS in 10 mM external K<sup>+</sup>.

*VvSOR* current was decreased by external 5 mM Ba<sup>2+</sup> (64±7% inhibition at 40 mV, n=3) and 10 mM TEA (67±3%, n=3), as well as by 10 µM verapamil (46±8%, n=3). Inhibition of *VvSOR* by these blockers is similar to that of *AtSKOR* (Gaymard et al., 1998) and *AtGORK* (Ache et al., 2000).

As already observed for *Arabidopsis* outward channels, *VvSOR* activity displays a dependence on external K<sup>+</sup>: decreasing the external K<sup>+</sup> concentration in the range

from 10 mM to 1 and 0 mM caused a decrease of the outward current (Fig. 4A) despite the increase in driving force for such a current.

VvSOR channel activity was reduced upon both internal and external acidification. At external pH 7.4, a decrease in internal pH from 7.4 to 7.2 (induced by the presence of acetate in the bathing solution, (Lacombe et al., 2000a) caused a strong decrease in VvSOR current (Fig. 4B), reminiscent of that reported for AtSKOR in similar conditions (Lacombe et al., 2000a). Acidification of the external solution from pH 8 to 5.8 was found to inhibit VvSOR currents, as previously shown for both AtSKOR and AtGORK currents (Ache et al., 2000; Lacombe et al., 2000a). The sensitivity of VvSOR to these changes in external pH was however rather weak, when compared to that of AtSKOR. Regarding this feature, VvSOR is thus closer to AtGORK (Ache et al., 2000) than to AtSKOR (Lacombe et al., 2000a).

### **Localization of SOR expression**

Transcripts encoding Shaker channels are not abundant in grapevine (Pratelli et al., 2002). Expression analyses were thus performed by RT-PCR, with RNAs extracted from leaves, young stalks, roots and berries at three different stages of development. VvSOR transcripts were detected in all aerial organs tested, but not in roots (Fig. 5A). The time course of VvSOR expression during berry maturation was examined using semi-quantitative RT-PCR on 6 samples collected along berry development. The VvSOR transcript accumulation, expressed relatively to that obtained for the *EF1 $\gamma$*  transcript (control), was low (Fig. 5B). The amount of VvSOR transcript reached a maximum at the time of véraison and then slightly decreased during maturation.

### **Modifying SOR expression level increases size and tartrate/malate ratio of grape berries**

With the objective to obtain additional clues about the physiological role of VvSOR, a reverse genetic approach has been set up. The VvSOR cDNA was cloned downstream of a CaMV 35S promoter in a pBIB-Hygro vector (Becker, 1990) and *Vitis* embryogenic calli were transformed with the resulting construct or the corresponding empty vector (control, see Methods). Control and SOR overexpressing plants (noted p35S::SOR) were regenerated and grown until fructification (see Methods).

During the first experiment (summer 2003), ripe berries sorted into the major density class (12<PAD<13) were numbered and weighted. The mean berry weight in this class was  $\approx$ 0.95 g (+/- 0.12) for the control and 1.55 g (+/- 0.11) for the p35S::SOR plants, yielding an increase in size of 61% for this main density class (50% for the bulk harvested ripe berries with 11<PAD<14).

The second experiment (spring 2004) was performed with controlled light, air temperature and humidity and watering conditions. Respectively 6 and 14 plants of the control and the p35S::SOR genotypes (corresponding to 3 and 7 independent lines respectively) were grown up to fruit ripeness that was achieved in May 2004. The time course of the increase in volume was recorded bunch by bunch for each plant of the two genotypes. Berries having been numbered in each bunch, the mean berry volume could be obtained for each bunch. Data obtained for both p35S::SOR and control plants were subsequently averaged, evidencing that berries of the former plants got a larger volume at ripeness than those of the latter ones (Fig. 6A). Expressing the data as percent of the volume at ripeness allowed to point out that the

difference between the p35S::SOR genotype and the control one appeared at the early stages of berry development (Fig. 6B, note that this is emphasized in the inset). The K<sup>+</sup> concentration in the berries was found to be essentially independent of the genotype (Fig. 7A), but, according to the difference in the average berry volume (Fig. 7B), the calculated K<sup>+</sup> content of berries was larger in p35S::SOR grapevines than in control ones.

In the same way, neither the pH nor the acidity were merely different between the studied genotypes neither at véraison nor at ripeness. The concentration and amount of accumulated tartaric acid (and to a lesser extent those of malic acid) were however different: more tartaric acid was found accumulated in berries from p35S::SOR grapevines than in berries from control ones (Fig. 7C). This resulted in a higher tartaric acid / malic acid ratio in musts obtained at ripeness from p35S::SOR grapevines than in musts from control ones (2.8 +/- 0.4 versus 1.9 +/- 0.6).

## DISCUSSION

The grapevine berry development displays two growth periods separated by a phase of slow or no growth (Mpelasoka et al., 2003). The entry in the second growth period is named "véraison" and corresponds to the sudden onset of ripening. The first growth period is characterized by a massive accumulation of organic acids (mostly tartaric and malic acids) in the vacuole (e.g., malic acid can be stored up to 200 mmol.l<sup>-1</sup>; Winkler et al., 1974). During the second growth period, cell expansion is mainly driven by accumulation of sugars, while the relative organic acid content decreases. The final concentration of both tartaric and malic acids reaches 30 to 50 mmol.l<sup>-1</sup>. The determinants of the accumulation of organic acids are still poorly understood, but a high level of K<sup>+</sup> in the berries is known to result in over-accumulation of malate versus tartrate (Hale, 1977). In addition, a high K<sup>+</sup> concentration promotes the precipitation of potassium tartrate during wine making while, at the œnological level, a high concentration of malate in the must should be avoided, as this leads to wines of poor quality. With the aim of identifying molecular mechanisms responsible for K<sup>+</sup> accumulation in the berry, we searched for transport systems, targeting the so-called Shaker channels since members of the plant Shaker family are known to mediate wholesale K<sup>+</sup> fluxes (Véry and Sentenac, 2003). We identified a Shaker-like K<sup>+</sup> channel, VvSOR, endowed with outward rectification and expressed in the berry.

VvSOR shares high amino acid similarity with the two *Arabidopsis* Shaker channels AtSKOR (Gaymard et al., 1998) and AtGORK (Ache et al., 2000). Plant Shaker channels have been shown to be involved in the uptake and subsequent transports of K<sup>+</sup> ions in the plant (Véry and Sentenac, 2003). They can be sorted into five subgroups, each one gathering channels with high sequence similarities and close functional properties (Pilot et al., 2003b). One of the subgroups of the family (referred to as SKOR subfamily or group #5; Pilot et al., 2003b) is composed of the outwardly rectifying channels, including AtSKOR (Gaymard et al., 1998) and AtGORK (Ache et al., 2000) from *Arabidopsis* and PtORK (Langer et al., 2002) from poplar (Fig. 1B). Other channels (from rice and *Samanea saman*) have also been included into that group on the basis of sequence identities (Pilot et al., 2003b), but AtSKOR, AtGORK, PtORK and VvSOR are so far the only members to be characterized at the functional level.

The behaviour of VvSOR in *Xenopus* oocytes is similar to that of the AtGORK, AtSKOR and PtORK channels and to the outwardly-rectifying K<sup>+</sup> conductances

characterised *in vivo* in guard cells (Blatt and Gradmann, 1997; Roelfsema and Prins, 1997) and root parenchyma cells (Roberts and Tester, 1995; de Boer and Wegner, 1997). The growing number of channels characterised at the functional level in that group allows to hypothesize about their structure-function relationships. Particularly, AtSKOR, AtGORK and VvSOR present markedly different sensitivities to extracellular protons. The weak sensitivity of VvSOR to extracellular acidification (Fig. 3C) is similar to that of VvGORK (around 30% inhibition for a pH decrease from 7.4 to 5.6; Ache et al., 2000) and less pronounced than that of SKOR (50% inhibition for a pH decrease from 7.4 to 6.4, (Ache et al., 2000; Lacombe et al., 2000). Histidine residues can play a role in pH sensitivity in Shaker channels (Madeja, 2000; Geiger et al., 2002). The absence of two histidine residues in the S4 transmembrane segment of VvSOR and AtGORK, when compared to AtSKOR, could explain the differences in sensitivity to pH between these channels (Fig. 1C, see Lacombe et al., 2000a).

The two paralogs of VvSOR in *Arabidopsis*, AtSKOR and AtGORK, strongly differ in their expression pattern. AtSKOR expression seems to be strictly restricted to the stele in the root (Gaymard et al., 1998) and to the pollen (Mouline et al., 2002), while AtGORK expression has been detected in all organs, roots, stems, leaves and flowers (Ache et al., 2000). The RT-PCR analyses indicated VvSOR expression in all the green aerial parts of the plants. Although no VvSOR transcripts could be found in roots (where both AtGORK (Ache et al., 2000) and AtSKOR (Gaymard et al., 1998) are expressed in *Arabidopsis*), the data suggest that the expression pattern of VvSOR is more related to that of AtGORK than to that of AtSKOR. It is therefore tempting to speculate that VvSOR would be expressed in guard cells and involved in the control of stomatal movements and transpirational water loss, as recently reported for AtGORK (Hosy et al., 2003). Grape berries possess a few guard cells before véraison (*i.e.*, the onset of ripening), but after véraison, the berry stomata regress in non-functional lenticels (Blanke et al., 1999). The expression pattern of a K<sup>+</sup> channel gene specifically expressed in guard cells, VvSIRK, was previously studied (Pratelli et al., 2002). VvSIRK transcript accumulation in the berry was found to dramatically decrease after véraison and to become rapidly undetectable after this stage. Conversely, VvSOR transcript accumulation in the berry was found to be almost constant all along the maturation. Moreover, based on the comparison of the RT-PCR data, the berry content in VvSIRK transcripts would be much lower than that in VvSOR transcripts. Thus the whole set of data strongly suggests that VvSOR expression in the berry is not restricted to the guard cells, but also takes place in other cell types or tissues. It has been shown that, during the berry development, K<sup>+</sup> is highly and constantly accumulated in the exocarp and in the cells surrounding the bunch of vascular tissues linking the pedicel to the berry. On the contrary, the flesh cells contain low amounts of K<sup>+</sup> (Possner and Kliewer, 1985; Coombe, 1987). VvSOR being an outwardly rectifying channel allowing sustained fluxes of K<sup>+</sup>, it could play a role in K<sup>+</sup> unloading from the vascular tissues, allowing K<sup>+</sup> translocation towards the exocarp cells.

Comparing p35S::SOR plants to control ones provided further evidence of the role of this gene in berry development, ripening and biochemical content. The larger berry size of the p35S::SOR grapevines (Fig 6A) resulted from a benefit got at the early stages of berry development (Fig. 6B), when cell divisions occur (Mpelasoka et al., 2003). During the subsequent stages of berry development, cell divisions are no longer observed but rather is cell expansion (Mpelasoka et al., 2003). VvSOR over-expression would thus have resulted in more cell division and would have poorly

affected the stages of cell expansion. Regarding the berry K<sup>+</sup> content, while K<sup>+</sup> concentration was essentially unchanged, the K<sup>+</sup> amount transferred to the berry was larger (Fig. 7A and B).

Starting from the véraison, the water and mineral supply to the grape berries tends to occur mainly via the phloem (Mpelasoka et al., 2003). It is worth noting that the *Arabidopsis* GORK channel has been reported to be expressed in phloem tissues, where it would play a role in K<sup>+</sup> unloading towards sink tissues (Becker et al., 2003). In this context, that the increase in berry size was closely related to the increase in bulk berry K<sup>+</sup> content suggests both that K<sup>+</sup> loading into the berry can be a growth limiting factor and that VvSOR (possibly expressed in phloem) plays a role in this loading and, thereby, in berry development.

Tartaric acid accumulation in berries is known to occur mainly at the early stages of development and to subsequently remain more or less constant (Mpelasoka et al., 2003). On the contrary, malic acid accumulation rather accompanies the cell expansion phase until the véraison before decreasing during the ripening (Mpelasoka et al., 2003). Accordingly to the above deduction that VvSOR over-expression mainly affected the early stages, tartaric acid amounts were actually more increased than malic acid ones in the berries harvested at the véraison (Fig. 7D and F). This higher tartrate/malate ratio in berries from p35S::SOR plants was even increased at ripeness. Therefore, in addition to yielding a larger berry mass, VvSOR overexpression increased the tartrate/malate ratio at ripeness.

A dominant negative strategy, based on overexpression of a mutated VvSOR channel endowed with dominant negative behaviour (obtained as previously described for other plant Shakers (Baizabal-Aguirre et al., 1999) has been initiated in order to further analyse the roles of VvSOR in the plant and, in particular, in berry development (in progress).

In conclusion, we have identified a new member of the plant Shaker-like K<sup>+</sup> channel family. This outwardly rectifying channel cloned in grapevine, VvSOR, displays functional features reminiscent of those of the GORK channel cloned in *Arabidopsis* and could be involved in K<sup>+</sup> loading in sink organs. Interestingly, over-expressing VvSOR in transgenic grapevines yielded increase in berry size and tartrate/malate ratio at ripeness, both phenotype traits potentially being of oenological interest.

## MATERIALS AND METHODS

The plant material and the techniques used for genomic analyses were described previously (Pratelli et al., 2002).

### Library screening

A berry cDNA library (cv Pinot noir; described in Fillion et al., 1999), prepared in λZAP II vector (Stratagene) was screened using standard plaque-lift method (Sambrook et al., 1989). A probe consisting in a mix of two cDNAs encoding *Arabidopsis* outward rectifying channels (SKOR (Gaymard et al., 1998) and KCO1 (Czempinski et al., 1997)) was radiolabelled with [<sup>32</sup>P]dATP + dCTP (random priming kit, Promega). About 3.10<sup>5</sup> plaques were screened. Hybridization was performed in Church buffer (Church and Gilbert, 1984) at 65°C for 48 h. Filters were washed twice in 2x SSC-0.1 % SDS for 10 min each at room temperature and once in 0.1x SSC-0.1 % SDS for 15 min at 65°C. The positive phage was converted into

plasmid clones using the R408 helper phage. After transformation and amplification in *E. coli* DH5 $\alpha$ , the insert was subcloned and sequenced.

### **RT-PCR**

The RNA-PCR and semi-quantitative RNA-PCR were performed as previously described (Pratelli et al., 2002). The specific primers for VvSOR were SOR forward (5' GCAAAGTTGCTTTAGGAAAGCCGGGGC 3') and SOR reverse (5' TTCACATAACAAATAGCTTCTGACC 3'). The primers for EF1 $\gamma$  were the same as in (Pratelli et al., 2002). Expected fragment sizes were 325 bp for SOR and 315 bp for EF1 $\gamma$ .

### **Expression in *Xenopus* oocytes and electrophysiological analyses**

VvSOR cDNA was cloned in the expression vector pCI and the construct pCI-SOR was injected into *Xenopus* oocytes (purchased from CRBM, CNRS, Montpellier, France) using a 10-15  $\mu$ m tip-diameter micropipette and a pneumatic injector (20 nl of 1  $\mu$ g. $\mu$ l $^{-1}$  plasmid solution per oocyte). Control oocytes were injected with 20 nl of 1  $\mu$ g. $\mu$ l $^{-1}$  empty plasmid solution.

Whole-cell currents were recorded as previously described (Lacombe and Thibaud, 1998) using the two-electrode voltage-clamp technique, 3 to 7 days after injection, on oocytes continuously perfused with bath solution (see figure legends). Intracellular pH was monitored using pH-sensitive microelectrodes prepared and used as previously described (Lacombe et al., 2000a; Lacombe et al., 2000b).

Patch-clamp experiments were performed on devitellinized oocytes as previously described (Lacombe et al., 2000a; Lacombe et al., 2000b).

### **Obtention and growing of transgenic *Vitis* lines**

The VvSOR ADNc was cloned between a 35S promoter and a nopaline synthase terminator and this construct was inserted in the pBIB-Hygro binary vector (Becker, 1990) for *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformations of grapevine embryogenic calli as described (Torregrosa, 1998; Pratelli et al., 2002).

Ten transformed calli were obtained, three carrying the empty pBIB-hygro plasmid (control) and seven the 35S::VvSOR-recombinant plasmid. About 1 year was needed to regenerate transgenic plants. Two individuals obtained from each of the transformed calli were put in soil for the subsequent studies.

### **Growing transgenic grapevines**

During the first two years, the regenerated grapevines were grown on soil in a standard greenhouse where they received basic cares only. The present data result from a first harvest made in 2003 and from a second one made in 2004. After the exceptionally hot summer in 2003, the plants were transferred in another greenhouse allowing some bioclimatic parameters to be controlled from the budding to the harvest: photoperiod (16 h with 150  $\mu$ mol.m $^{-2}$ .s $^{-1}$  of photon), air hygrometry (50 %) and temperature (kept between 20 and 40°C).

### **Berry development and biochemical studies**

From 10 days after flowering, the volume of each bunch was estimated by steeping it in a vessel filled with water up to a reference line (2004 experiment only). The amount of water used was obtained by weighting. The shape and size of the vessel was adapted to each bunch so that this non destructive volume determination yielded data with a rough precision of 1%. The average berry volume of a given bunch was obtained by dividing the bunch volume by the number of berries on this bunch.

Cautious palpation of berries and daily observation (both 2003 and 2004 experiments) allowed to detect early softening and colour change marking the inception of ripening ("véraison") for one or few berries in a bunch. Happening of véraison for any given bunch was corroborated by the volume time-course data obtained by the above described volumetric method (see Fig 6). Some berries (ca. 10% of each bunch) were harvested at that time for biochemical analysis at the so-called "green state". The remaining berries were harvested at maturity and similar analyses yielded "ripeness" data.

For the biochemical analyses, berries were excised with a 1 mm long pedicel piece. The excised berries and the remains were weighted separately for each bunch. All the berries from a given plant were then pooled and subsequently sorted into density classes by testing their ability to float in a series of eight salted-water bathes of different concentrations. Only four density classes were kept: the two mostly populated ones, the lower density ones were pooled into a single one and the upper density ones were pooled into a single one. Each of these four density classes was numbered and weighted. Berries were then carefully crushed to separate the juice (must) from almost dried skins and other solid matters including intact seeds. For any must sample, the weight and volume were noted and the potential alcoholic degree (PAD) was measured with a portable refractometer.

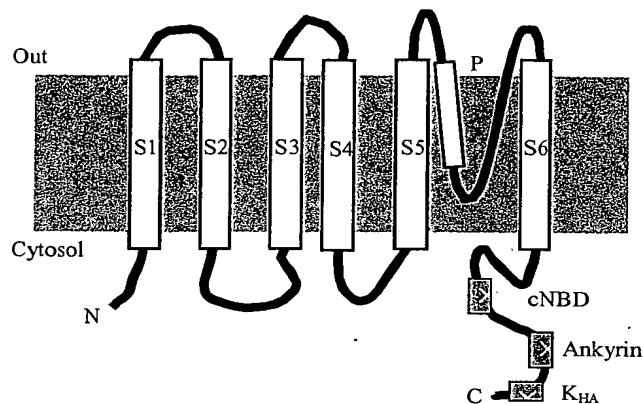
The pH and acidic content (titration to pH 8.3 with 0.1 N KOH), K<sup>+</sup> concentration (flame photometry), malic and tartaric acids concentrations (high-pressure liquid chromatography) were measured on aliquots of any must sample. "Ripeness" data shown in Figure 7 are from assays performed on the musts obtained from berries sorted in the two major density classes (corresponding to a potential alcoholic degree of 12 and 13).

## LITERATURE CITED

- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R** (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. *FEBS Lett.* **486:** 93-98
- Baizabal-Aguirre VM, Clemens S, Uozomi N, Schroeder JI** (1999) Suppression of inward-rectifying K<sup>+</sup> channels KAT1 and AKT2 by dominant negative point mutations in the KAT1 alpha-subunit. *J. Memb. Biol.* **167:** 119-125
- Becker D** (1990) Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes. *Nucleic Acid Res.* **18:** 203
- Becker D, Hoth S, Ache P, Wenkel S, Roelfsema MRG, Meyerhoff O, Hartung W, Hedrich R** (2003) Regulation of the ABA-sensitive *Arabidopsis* potassium channel gene GORK in response to water stress. *FEBS Lett.* **554:** 119-126
- Blanke MM, Pring RJ, Baker EA** (1999) Structure and elemental composition of grape berry stomata. *J. Plant Physiol.* **154:** 477-481
- Blatt MR, Gradmann D** (1997) K<sup>+</sup>-sensitive gating of the K<sup>+</sup> outward rectifier in *Vicia* guard cells. *J. Memb. Biol.* **158:** 241-256

- Church GW, Gilbert W** (1984) Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 1991-1995
- Coombe BG** (1987) Distribution of solutes within the developing grape berry in relation to its morphology. American Journal of Enology and Viticulture **38**: 120-127
- Czempinski K, Zimmermann S, Ehrhardt T, Müller-Röber B** (1997) New structure and function in plant K<sup>+</sup> channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca<sup>2+</sup> dependency [published erratum appears in EMBO J 1997 Nov 17;16(22):6896]. The EMBO J **16**: 2565-2775
- de Boer AH, Wegner LH** (1997) Regulatory mechanisms of ion channels in xylem parenchyma cells. J. Exp. Bot. **48**: 441-449
- Decroocq V, Fave MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S** (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. Theoretical and Applied Genetics **106**: 912-922.
- Dutruc-Rosset G** (2003) The state of vitiviniculture in the world and the statistical information in 2000. O.I.V., Paris
- Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S** (1999) Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. Plant Physiol. **120**: 1083-1093
- Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, Michaux-Ferriere N, Thibaud JB, Sentenac H** (1998) Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. Cell **94**: 647-655
- Geiger D, Becker D, Lacombe B, Hedrich R** (2002) Outer pore residues control the H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> sensitivity of the *Arabidopsis* potassium channel AKT3. Plant Cell **14**: 1859-1868.
- Hale CR** (1977) Relation between potassium and the malate and tartrate contents of grape berries. Vitis **16**: 9-19
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Poree F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very AA, Simonneau T, Thibaud JB, Sentenac H** (2003) The *Arabidopsis* outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**: 5549-5554.
- Hrazdina G, Parsons GF, Mattick LR** (1994) Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. Am. J. Enol. Viti. **35**: 220-227
- Lacombe B, Pilot G, Gaymard F, Sentenac H, Thibaud J-B** (2000) pH control of the plant outwardly-rectifying potassium channel SKOR. FEBS Lett. **466**: 351-354
- Lacombe B, Pilot G, Michard E, Gaymard F, Sentenac H, Thibaud J-B** (2000) A Shaker-like K<sup>+</sup> channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis*. Plant Cell **12**: 837-851
- Lacombe B, Thibaud J-B** (1998) Evidence for a multi-ion pore behavior in the plant potassium channel KAT1. J. Memb. Biol. **166**: 91-100
- Langer K, Ache P, Geiger D, Stinzing A, Arend M, Wind C, Regan S, Fromm J, Hedrich R** (2002) Poplar potassium transporters capable of controlling K<sup>+</sup> homeostasis and K<sup>+</sup>-dependent xylogenesis. Plant J **32**: 997-1009
- Madeja M** (2000) Extracellular Surface Charges in Voltage-Gated Ion Channels. News Physiol. Sci. **15**: 15-19
- Mouline K, Véry A-A, Gaymard F, Boucherez J, Pilot G, Devic M, Bouchez D, Thibaud J-B, Sentenac H** (2002) Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K<sup>+</sup> channel in *Arabidopsis*. Genes and Dev. **16**: 339-350

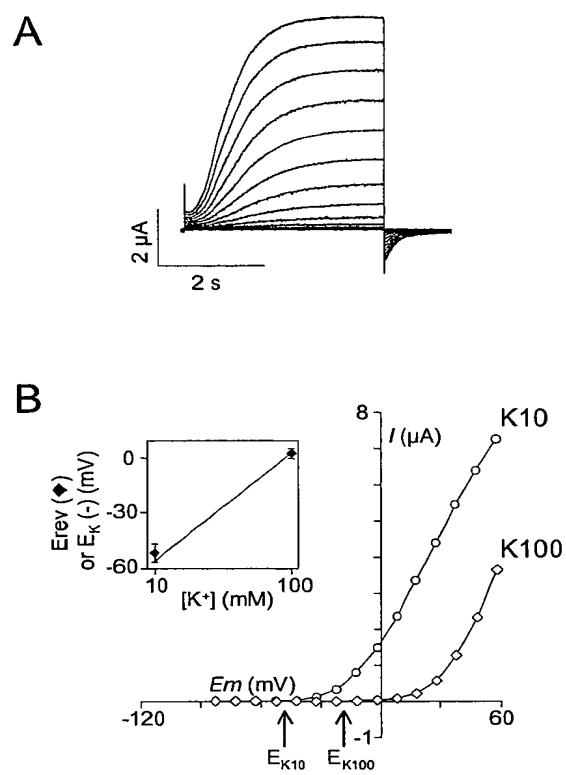
- Mpelasoka BS, Schachtman DP, Treeby MT, Thomas M** (2003) A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation. *Aust. J. Plant. Physiol.* **9**: 154-168
- Pilot G, Pratelli R, Gaymard F, Meyer Y, Sentenac H** (2003) Five group-distribution of the Shaker-like K<sup>+</sup> channel family in higher plants. *J. Mol. Evol.* **56**: 418-434
- Possner DRE, Kliewer WM** (1985) The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis* **24**: 229-240
- Pratelli R, Lacombe B, Torregrosa L, Gaymard F, Romieu C, Thibaud JB, Sentenac H** (2002) A grapevine gene encoding a guard cell K<sup>+</sup> channel displays developmental regulation in the grapevine berry. *Plant Physiol.* **128**: 564-577
- Roberts SK, Tester M** (1995) Inward and outward K<sup>+</sup>-selective currents in the plasma membrane of protoplasts from maize root cortex and stele. *Plant J.* **8**: 811-825
- Roelfsema MRG, Prins HBA** (1997) Ion channels in guard cells of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **202**: 18-27
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edn., Ed Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor
- Torregrosa L** (1998) A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L. *Vitis* **37**: 91-92
- Véry A-A, Sentenac H** (2003) Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 575-603
- Winkler A, Cook J, Lider JA, Kliewer WM** (1974) General viticulture. University of California press, Berkeley
- Zimmermann S, Sentenac H** (1999) Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Cur. Op. Plant Biol.* **2**: 477-482

**A****B**

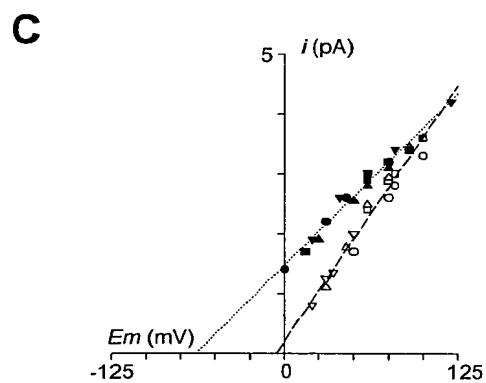
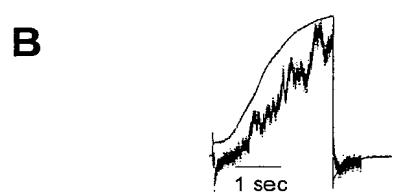
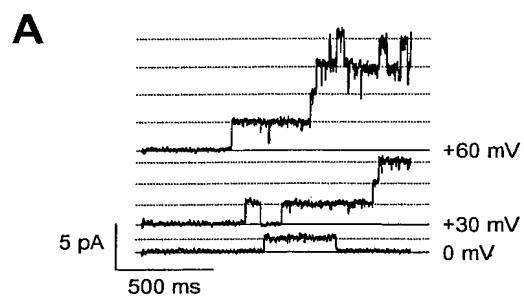
		S5		P		
VvSOR	201	LATTLPQ	SE	EGYT WIGSL	KLG DYS	YSHFREIDIW KRYTTSLYF
AtSKOR	239	LATTLPQ	SQ	EGYT WIGSL	KLG DYS	YSKFREIDLWTRYTTSMYF
AtGORK	223	LATTLPQ	EN	EGYT WIGSL	KLG DYS	YENFREIDLW KRYTTALYF
PTORK	240	LATTMPP	SQ	EGYT WIGSL	QM GDYH	YTHFREIDLW KRYITSLYF
AtAKT1	212	IAARNSN	--	PAK TWIGAN	-----	VANFLEESLWMRYVTSMYW
AtKAT1	219	IADRYPN	--	PRK TWIGAV	-----	YPNFKEASLWNRYVTALYW
VvSIRK	212	IADYPD	--	PERTWIGAV	-----	YPNFKEEENLWD RYVTSIYW
						242
						281
						265
						282
						246
						264
						245

**C**

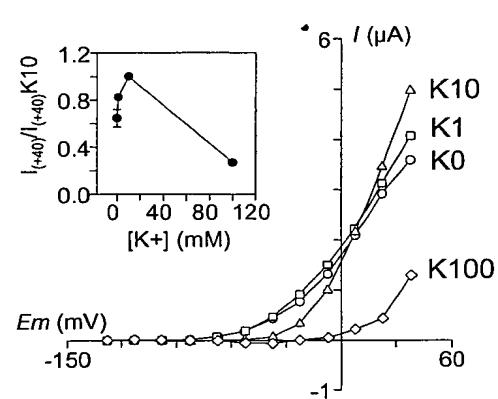
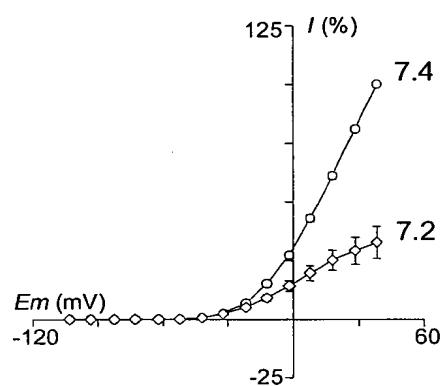
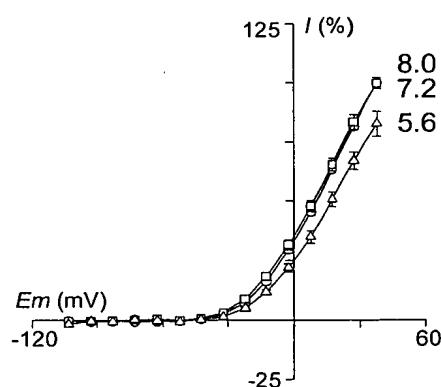
		S4
VvSOR	YLLWIRLIRV	C KVTDFF Q NLEKDTRINY
AtGORK	YLLWIRLFRV	R KVVEFF Q RLEKDTRINY
AtSKOR	YLLLIRLYRV	H RVILFF H KMEKDIRINY

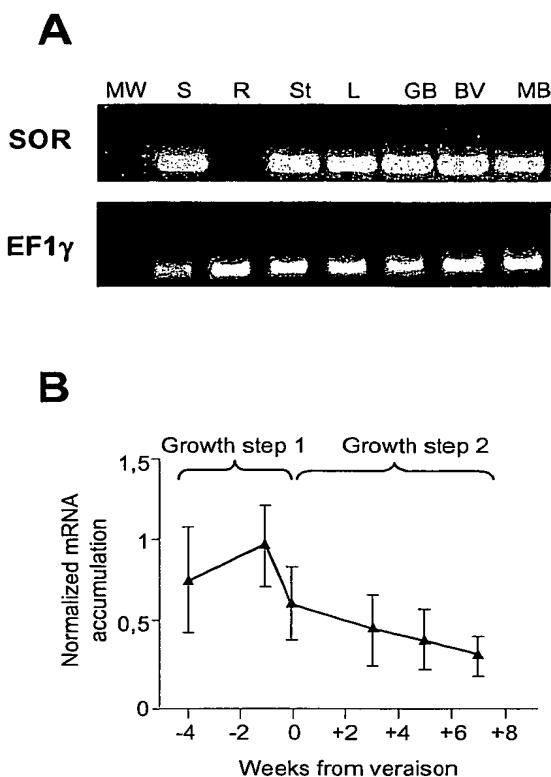


**Pratelli et al.** Figure 2

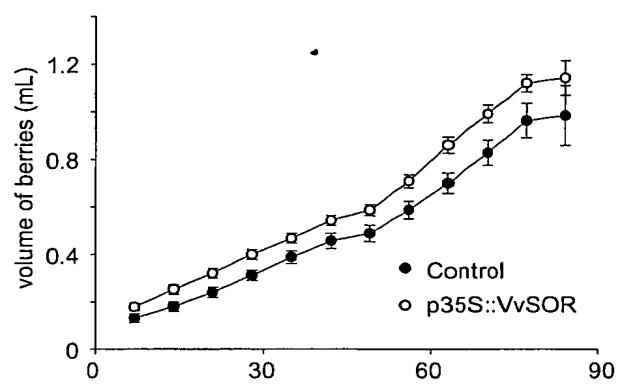
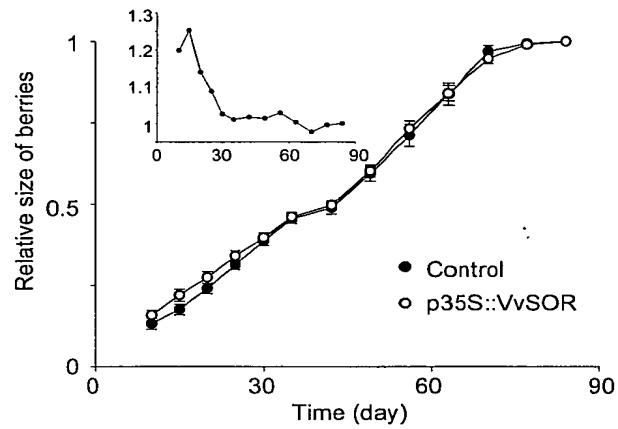


*Pratelli et al.* Figure 3

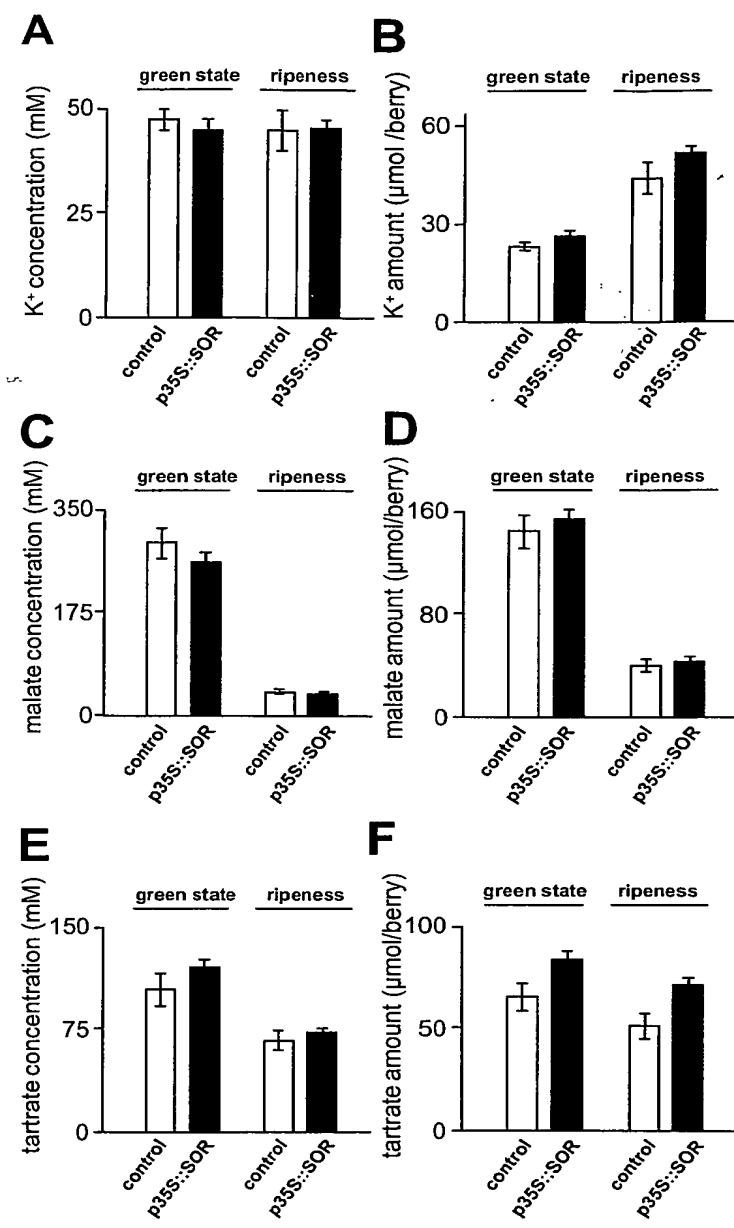
**A****B****C****Pratelli et al. Figure 4**



*Pratelli et al.* Figure 5

**A****B**

**Pratelli et al. Figure 6**

**Pratelli et al.** Figure 7

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** *VvSOR* encodes a Shaker-like  $K^+$  channel highly similar to *Arabidopsis* outwardly rectifying channels. A, Predicted structure of *VvSOR* and plant Shaker-like channels. S1 to S6: the 6 transmembrane segments which form the channel hydrophobic core. P: pore domain. cNBD: putative cyclic-nucleotide binding domain. Ankyrin: domain displaying ankyrin-like repeats. K<sub>HA</sub>: domain rich in acidic and hydrophobic amino-acids. B, Sequence comparison of the S5-P linker of *VvSOR*, *AtSKOR* (CAA11280), *AtGORK* (AJ279009), *PtORK* (AJ271446), all belonging to the 5<sup>th</sup> (according to Pilot et al., 2003) subgroup of plant Shaker channels and characterised as outward channels, *AtAKT1* (1<sup>st</sup> subgroup, S23606), *AtKAT1* and *VvSIRK* (2<sup>nd</sup> subgroup, S32816 and AF359521, resp.) which are inward channels. C, Comparison of the S4 sequence in *VvSOR*, *AtGORK* and *AtSKOR*.

**Fig. 2.** Macroscopic current analysis in *Xenopus* oocytes shows that *VVSOR* is an outwardly-rectifying voltage-gated channel. A: Current traces recorded in a 10 mM  $K^+$  external solution in response to 15 successive stimulations of 3.75 s each, at voltage values ranging from -80 to +60 mV (in 10 mV increments, from a holding potential of -80 mV). These current traces are representative of data obtained on 5 different oocytes. B: Current-voltage curves. The steady-state current recorded at the end of the activation step was plotted against the membrane potential for 2 different external  $K^+$  concentrations: 100 mM (diamonds) and 10 mM (circles). The corresponding  $E_K$  values are indicated. Inset: plotting the reversal potential  $E_{rev}$  for the *VvSOR* current (closed diamonds; mean  $\pm$  SE;  $n = 4$ ; values obtained from tail current analysis) versus the external concentration of  $K^+$  revealed that  $E_{rev}$  shifted by 55 mV for a ten-fold increase in external  $K^+$  concentration, as expected for a selective  $K^+$  channel. Solid line in the inset:  $K^+$  equilibrium potential ( $E_K$ ) calculated with the Nernst equation.

**Fig. 3.** Single channel analysis of *VvSOR* in *Xenopus* oocytes. A, *VvSOR* single-channel currents in a *Xenopus* oocyte recorded in the cell-attached configuration at 0, +30 and +60 mV (C, closed state; O1, O2, O3 and O4, one, two, three and four open channels, respectively). The pipette solution contained 10 mM  $K^+$ . B, Comparison of SOR activation kinetics obtained by macroscopic currents (two-electrode voltage-clamp, upper trace) and single channel (patch clamp, cell attached, lower trace, data points are the means of 150 episodes at +40 mV). C, single-channel current-voltage relationship in two different external (pipette)  $K^+$  concentrations: 10 mM (closed symbols) and 100 mM (open symbols). Each symbol corresponds to a different patch ( $n = 4$ ). Dotted lines are linear regressions allowing determination of the single channel conductance: 23 pS in 10 mM  $K^+$  and 34 pS in 100 mM  $K^+$ .

**Fig. 4.** *VvSOR* is  $K^+$  and  $H^+$  sensitive. A, Effect of external  $K^+$  concentration on *VvSOR* steady-state current. The external solution contained 1 mM  $CaCl_2$ , 1.5 mM  $MgCl_2$ , 5 mM HEPES (pH 7.4) and 1 mM KCl/99 mM NaCl (squares), or 10 mM KCl/90 mM NaCl (triangles), or 100 mM KCl (diamonds), or 100 mM NaCl (circles). While the driving force for outward  $K^+$  current was increased by decreasing external

$K^+$  concentration from 10 to 0 mM, the current decreased. This is shown by the inset where the value of the steady-state current at +40 mV is plotted against the external  $K^+$  concentration. B, Effect of internal acidification. Relationship of normalized steady-state VvSOR current to the membrane potential at internal pH 7.4 (100 mM KCl, pH 7.4, in the bath, circles) or at internal pH 7.2 (100 mM K-acetate, pH 7.4, in the bath, diamonds) (mean  $\pm$  SE; n=3 to 7 oocytes). C, Effect of external acidification. Relationship of the normalized steady-state VvSOR current to the membrane potential (in 10 mM external  $K^+$ ) at external pH 8.0 (squares), or 7.5 (circles), or 5.6 (triangles) (mean  $\pm$  SE; n = 3 to 7 oocytes).

**Fig. 5.** SOR is expressed in the aerial organs. A, Localization of the expression of VvSOR by RT-PCR. RNA were extracted from stalks (S), roots (R), stems (St), leaves (L), green berries (GB), berries at véraison (BV) and mature berries (MB). MW: molecular weight markers. RT-PCR reactions were run with specific primers for VvSOR cDNA and for *EF1 $\gamma$*  cDNA (used as a positive control; see experimental procedures). B: Expression of VvSOR in berry pericarp at different developmental stages analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The results (mean  $\pm$  SE, n = 3) were normalized by using the *EF1 $\gamma$*  control. Steps of berry development are expressed in weeks before/after véraison (onset of ripening; see discussion).

**Fig. 6.** Berries from VvSOR-overexpressing grapevines are bigger than berries from control ones. A, The volume of bunches was periodically measured by a non destructive method and the average berry size was calculated as detailed in the "Materials and Methods" section. Absolute values are displayed from day 0 (flowering) to ca. day 90 (harvest at ripeness). B, Relative values, expressed in percent of the value at ripeness, are displayed. The inset in B shows the ratio at any time between the data for VvSOR-overexpressing grapevines and the data for control ones. Data are given as mean  $\pm$  SE of 2000 and 3200 values respectively from 14 p35S::SOR grapevines (7 different genotypes) and 6 control grapevines (3 different genotypes).

**Fig. 7.**  $K^+$ , malic acid and tartaric acid content of berries from p35S::SOR grapevines and control ones. A,  $K^+$  concentration (mean  $\pm$  SE) in berries harvested at véraison or at ripeness from control grapevines (white bars, n = 6) or VvSOR-overexpressing ones (black bars, n = 14). B,  $K^+$  amount accumulated per berry (data from A multiplied by the average berry volume from Fig. 6A). Same legend and sampling as in A. C / D and E / F, respectively malic acid concentration / amount and tartrate ones. Same legend and sampling as in A / B for  $K^+$ . "Green-state" data regards the liquid extract (20% of solid matter left) from the berries harvested at véraison and subsequently pooled for any genotype. "Ripeness" data regards the must (10% of solid matter left) from those berries harvested at ripeness, which fell in the two major density classes (see Methods).

## **IV.- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Le canal GORK est responsable de la conductance potassique sortante activée par la dépolarisation de la cellule de garde. En effet, cette conductance est absente chez le mutant KO *gork-1*. Il était couramment admis que la fermeture stomatique impliquait une sortie massive de K<sup>+</sup>, or les plantes *gork-1* ne montrent qu'une faible altération de la cinétique de fermeture stomatique en fin de photopériode. Deux hypothèses permettraient d'expliquer ce faible phénotype observé sur plante entière. Il pourrait exister une autre voie pour l'efflux de potassium, ou un autre osmoticum que K<sup>+</sup> pourrait être mis en jeu lors de la fermeture stomatique en fin de journée.

Des canaux différents des canaux Shaker et pouvant cependant permettre un efflux de K<sup>+</sup> ont en effet été identifiés sur la membrane des cellules de garde : des canaux mécanosensibles (Cosgrove and Hedrich, 1991), ou des canaux cationiques non sélectifs de type cNGCs (Talke et al., 2003). Malheureusement, peu de données sont disponibles sur ces canaux mécanosensibles et il est difficile de discuter l'hypothèse de leur rôle dans les mouvements stomatiques. Les cNGCs, jouent probablement un rôle dans la machinerie stomatique mais ils semblent impliqués plus dans les mécanismes de signalisation que dans les flux massifs d'ions (Talke et al., 2003).

Le rôle du potassium dans les mécanismes de fermeture stomatique a déjà été discuté par Talbott et Zeiger qui observent une nette augmentation de la concentration des osmotica organiques (sucres) tout au long de la journée, au détriment de la concentration en potassium (Talbott and Zeiger, 1998). Cela expliquerait le faible impact de la mutation *gork-1* sur la fermeture stomatique à la tombée de la nuit qui pourrait mettre en jeu les sucres plutôt que K<sup>+</sup>. L'effet de la disruption de GORK, est d'ailleurs plus marqué lors des expériences réalisées sur épidermes pelés, c'est à dire sur un système n'ayant pas les apports en sucre issu de la photosynthèse des cellules mésophylliennes.

En collaboration avec Anne Lebaudy (doctorante au laboratoire), j'ai mis au point des plantes mutantes ne possédant plus de conductance potassique entrante sur la membrane des cellules de garde, en transformant des plantes portant une insertion d'ADN-T dans le gène KAT2 (plantes KO) par un polypeptide KAT2 dominant négatif. L'analyse électrophysiologique de protoplastes de cellules de garde de ces plantes confirme une complète disparition des courants voltage dépendant entrants, et l'analyse physiologique révèle que la mutation affecte très fortement l'ouverture stomatique à la lumière. Ces résultats démontrent que le potassium peut jouer un rôle prépondérant en tant qu'osmolyte de la cellule de garde. Le relativement faible impact de la disruption de GORK sur la fermeture stomatique en fin de photopériode suggère que GORK serait impliqué dans l'adaptation du degré d'ouverture aux conditions environnementales plutôt que dans fermeture à l'obscurité. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait comparer les transpirations des plantes sauvages et *gork-1* dans des conditions climatiques fluctuantes en termes de demande évaporative, de lumière ou de CO<sub>2</sub>.

Le "système hétérologue protoplaste de tabac" initialement mis en place pour l'étude de la sous-unité AtKC1 est un outil qui devrait permettre la caractérisation fonctionnelle de certains au moins des nombreux canaux végétaux qui ne s'expriment pas dans les systèmes hétérologues classiques. Un premier succès dans ce domaine a déjà été obtenu avec le canal AKT6. Ce canal Shaker d'*Arabidopsis* (sous famille des AKT; (Pilot et al., 2003c), n'a jamais pu être caractérisé fonctionnellement en ovocyte de xénope. Nous avons récemment exprimé ce canal dans les cellules de tabac, et enregistré des courants entrants

exogènes, s'activant pour des potentiels d'environ -120 mV. Ces résultats sont encore préliminaires et la caractérisation de AKT6 reste à faire. Mais cette première expression fonctionnelle de AKT6 confirme l'utilité du système d'expression que nous avons mis au point et ouvre peut-être la voie vers une caractérisation prochaine de certains canaux récalcitrants de type KCO, cNGC ou CLC. De plus, le rendement élevé de co-transformation offert par ce système pourrait permettre d'étudier, dans un contexte végétal, la régulation de l'activité des canaux par des protéines de type phosphatase, kinase, protéine G, etc. ainsi que de tester les partenaires hypothétiques identifiés par le programme de criblage systématique de banques d'ADNc d'*Arabidopsis* dirigé dans l'équipe par Isabelle Chérel.

Le travail effectué sur la sous unité AtKC1 ouvre, quant à lui, deux types de perspectives différentes, celles concernant l'hétéromérisation entre la sous-unité AtKC1 et les autres sous-unités Shaker, et celles concernant le rôle physiologique d'AtKC1.

Des expériences préliminaires ont été effectuées afin de déterminer si la stoechiométrique de l'hétéromérisation AKT1/AtKC1 a un effet fonctionnel. Pour cela, nous avons modifié les rapports entre les plasmides lors de la co-transformation, afin de modifier le niveau d'expression relatif de chaque sous-unité. Il s'est avéré qu'une augmentation de la quantité de plasmide AtKC1 menait à une augmentation du nombre de cellules présentant des courants de type 4 (ayant un potentiel d'activation proche de -160 mV, voir la figure 1 de l'article 3). Cela semble indiquer que le potentiel d'activation des hétéromères est dépendant du nombre de sous-unités AtKC1 présentes dans le canal selon un patron qui pourrait être le suivant: 0 AtKC1 / 4 AKT1 avec activation à -40 mV (pattern 2, figure 1 d de l'article 3); 1 AtKC1 / 3 AKT1 avec activation à -100 mV (pattern 3, figure 1 e de l'article 3); 2 AtKC1 / 2 AKT1 avec activation à -160 mV (pattern 4, figure 1 f de l'article 3). Cette hypothèse pourrait être testée en exprimant, par exemple, une fusion AtKC1::AKT1 qui devrait conduire au pattern 4. Il serait aussi intéressant de regarder si des mécanismes stoechiométriques similaires sont présents lors des hétéromérisations entre AtKC1 et KAT1 (dont l'hétéromérisation est avérée, figure 1 k de l'article 3), et éventuellement les autres sous unités Shaker codant des canaux entrants (peut être KAT2, AKT2, AKT6 et SPIK).

Au niveau physiologique, le phénotype étonnant du mutant d'insertion dans le gène AtKC1 doit être étudié dans le détail. L'effet de la mutation sera recherché à toutes les étapes (accessibles à la mesure) de la circulation de K<sup>+</sup> dans la plante. Ceci pourrait permettre de découvrir lesquelles de ces étapes sont impliquées dans la résistance aux fortes humidités : absorption de K<sup>+</sup> afin de moduler la poussée racinaire, distribution foliaire du potassium de façon à réguler la guttation, etc.? Mais il serait aussi intéressant de déterminer la cause de l'excès d'ouverture stomatique des plantes KO *Atkc1-2*. En effet la modélisation des mouvements stomatiques, à partir des données de transpiration obtenues dans la chambre des échanges gazeux du CEA à Cadarache (expérience identique à celle présenté à la figure 5A de l'article 1), ne révèle pas de différences dans les cinétiques d'ouverture et de fermeture, mais plutôt un effet de la mutation sur l'état stationnaire du degré d'ouverture des stomates. Il conviendra de rechercher une éventuelle modification de la pression des cellules épidermiques, ou des variations de teneur apoplasmique en K<sup>+</sup>.

La suite à donner au travail sur la vigne pourrait, dans un premier temps, consister à tenter de mieux comprendre comment la surexpression d'un canal

potassique sortant peut augmenter les divisions cellulaires pendant la phase précoce du développement de la baie. Un hypothèse de travail est que le flux de K<sup>+</sup> vers la baie en formation est plus important et que cela entraîne un plus grand nombre de divisions cellulaires/ Cette hypothèse pourrait être testée en apportant à des plants de génotype sauvage une suralimentation potassique pendant les phases précoce de développement de la baie (ie, pendant les 10 à 15 jours qui suivent l'anthèse). Au cas où un tel traitement conduirait à reproduire le phénotype du mutant, il pourrait être envisagé une application agronomique.

Enfin, l'augmentation de la taille moyenne des baies a été plus importante au cours de l'expérience réalisée en 2003 (année de la canicule), conduite dans une serre non climatisée, avec une vendange estivale qu'au cours de l'expérience de 2004, conduite en serre climatisée, avec une vendange printanière (+45% dans le premier cas contre + 20% dans le second). Or, les conditions climatiques du vignoble méditerranéen sont plus proches des conditions de l'expérience de 2003. Il faudrait donc réexaminer l'effet de l'environnement sur le phénotype des vignes surexprimant VvSOR.

En conclusion, j'aurai constaté tout au long de ma thèse à quel point l'interdisciplinarité est nécessaire à la caractérisation physiologique d'une protéine, et que, de façon surprenante, une des plus grande difficulté est souvent de trouver des techniques permettant les études physiologiques. En effet, il est extrêmement difficile de caractériser le phénotype d'une plante mutante, car les facteurs environnementaux et internes à la plante perturbent les analyses, et masquent ce phénotype. La caractérisation physiologique des mutants étudiés pendant ma thèse n'aurait pu se faire sans les connaissances et l'aide de Thierry Simonneau du Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux, d'Alain Vavasseur du CEA de Cadarache, et de Charles Romieu et Laurent Torregrossa de l'institut d'arboriculture.

## **V.- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

# A

- Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G. and Hedrich, R.** (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. *FEBS Lett.* **486**, 93-98.
- Ahn, S.J., Shin, R. and Schachtman, D.P.** (2004). Expression of KT/KUP genes in *Arabidopsis* and the role of root hairs in K<sup>+</sup> uptake. *Plant Physiol* **134**, 1135-1145.
- Allen, G.J. and Sanders, D.** (1996). Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. *Plant J* **10**, 1055-1069.
- Allen, G.J. and Schroeder, J.I.** (2001). Combining genetics and cell biology to crack the code of plant cell calcium signaling. *Sci STKE* **2001**, RE13.
- Allen, G.J., Amtmann, A. and Sanders, D.** (1998). Calcium-dependent and calcium-independent K<sup>+</sup> mobilization channels in *Vicia faba* guard cell vacuoles. *J Exp Bot* **49**, 305-318.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E. and Schroeder, J.I.** (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**, 1053-1057.
- Amodeo, G., Escobar, A. and Zeiger, E.** (1994). A Cationic Channel in the Guard Cell Tonoplast of *Allium cepa*. *Plant Physiol* **105**, 999-1006.
- Anderson, B.E., Ward, J.M. and Schroeder, J.I.** (1994). Evidence for an Extracellular Reception Site for Abscisic Acid in *Commelina* Guard Cells. *Plant Physiol* **104**, 1177-1183.
- Anderson, J.A., Huprikar, S.S., Kochian, L.V., Lucas, W.J. and Gaber, R.F.** (1992). Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3738-3740.
- Armstrong, C.M. and Bezanilla, F.** (1973). Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* **242**, 459-461.
- Armstrong, F., Leung, J., Grabov, A., Brearley, J., Giraudat, J. and Blatt, M.R.** (1995). Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K<sup>+</sup> channels is suppressed by abi1-1, a mutant *Arabidopsis* gene encoding a putative protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9520-9524.
- Asai, N., Nakajima, N., Tamaoki, M., Kamada, H. and Kondo, N.** (2000). Role of malate synthesis mediated by phosphoenolpyruvate carboxylase in guard cell in the regulation of stomatal movement. *Plant cell physiol.* **4**, 10-15.
- Assmann, S.M.** (1993). Signal transduction in guard cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 345-375.
- Assmann, S.M.** (1999). The cellular basis of guard cell sensing of rising CO<sub>2</sub>. *Plant Cell Env* **22**, 629-637.
- Assmann, S.M.** (2002). Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *Plant Cell* **14 Suppl**, S355-373.
- Assmann, S.M. and Shimazaki, K.** (1999). The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiol* **119**, 809-816.
- Assmann, S.M. and Wang, X.Q.** (2001). From milliseconds to millions of years: guard cells and environmental responses. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 421-428.

**Assmann, S.M., Simoncini, L. and Schroeder, J.I.** (1985). Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **318**, 285-287.

**Assmann, S.M., Snyder, J.A. and Lee, Y.R.J.** (2000). ABA-deficient (aba1) and ABA-insensitive (abi1-1, abi2-1) mutant of *Arabidopsis* have a wild-type stomatal response to humidity. *Plant Cell Env* **23**, 387-395.

## B

- Baizabal-Aguirre, V.M., Clemens, S., Uozumi, N. and Schroeder, J.I.** (1999). Suppression of inward-rectifying K<sup>+</sup> channels KAT1 and AKT2 by dominant negative point mutations in the KAT1 alpha-subunit. *J Membr Biol* **167**, 119-125.
- Barbier-Bryggo, H., Vinauger, M., Colcombet, J., Ephritikhine, G., Frachisse, J. and Maurel, C.** (2000). Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochim Biophys Acta* **1465**, 199-218.
- Bauer, C.S., Hoth, S., Haga, K., Philippar, K., Aoki, N. and Hedrich, R.** (2000). Differential expression and regulation of K<sup>+</sup> channels in the maize coleoptile: molecular and biophysical analysis of cells isolated from cortex and vasculature. *Plant J* **24**, 139-145.
- Baully, J.M., Sealy, I.M., Macdonald, H., Brearley, J., Droege, S., Hillmer, S., Robinson, D.G., Venis, M.A., Blatt, M.R., Lazarus, C.M. and Napier, R.M.** (2000). Overexpression of auxin-binding protein enhances the sensitivity of guard cells to auxin. *Plant Physiol* **124**, 1229-1238.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G.** (1993). In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris* **316**, 1194-1199.
- Becker, D.** (1990). Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes. *Nucl Acid Res* **18**, 203.
- Becker, D., Hoth, S., Ache, P., Wenkel, S., Roelfsema, M.R.G., Meyerhoff, O., Hartung, W. and Hedrich, R.** (2003). Regulation of the ABA-sensitive *Arabidopsis* potassium channel gene GORK in response to water stress. *FEBS Lett* **554**, 119-226.
- Bei, Q. and Luan, S.** (1998). Functional expression and characterization of a plant K<sup>+</sup> channel gene in a plant cell model. *Plant J* **13**, 857-865.
- Bessis, R. and Fournioux, J.C.** (1992). Zone d'abscission et coulure de la vigne. *Vitis* **31**, 9-21.
- Blanke, M.M., Pring, R.J. and Baker, E.A.** (1999). Structure and elemental composition of grape berry stomata. *J Plant Physiol* **154**, 477-481.
- Blatt, M.R.** (1988). Potassium-dependent, bipolar gating of K<sup>+</sup> channels in guard cells. *J Membr Biol* **102**, 235-246.
- Blatt, M.R.** (2000a). Cellular signalling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 221-241.
- Blatt, M.R.** (2000b). Ca<sup>2+</sup> signalling and control of guard-cell volume in stomatal movements. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 196-204.

- Blatt, M.R. and Thiel, G.** (1994). K<sup>+</sup> channels of stomatal guard cells: bimodal control of the K<sup>+</sup> inward-rectifier evoked by auxin. *Plant J* **5**, 55-68.
- Blatt, M.R. and Gradmann, D.** (1997). K<sup>+</sup>-sensitive gating of the K<sup>+</sup> outward rectifier in *Vicia* guard cells. *J Membr Biol* **158**, 241-256.
- Butt, A.D., Blatt, M.R. and Ainsworth, C.C.** (1997). Expression, evolution and genomic complexity of potassium ion channel genes of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* **150**, 652-660.

## C

- Candolfi-Vasconcelos, M.C. and Koblet, W.** (1990). Yield, fruit quality, bud fertility and starch reserves of the wood as a function of leaf removal in *Vitis vinifera* - Evidence of compensation and stress recovering. *Vitis* **29**, 199-221.
- Candolfi-Vasconcelos, M.C., Koblet, W., Howell, G.S. and Zweifel, W.** (1994). Influence of defoliation, rootstock, training system and leaf position on gas exchange of Pinot noir grapevines. *Am J Enol Viti* **45**, 173-180.
- Cao, Y., Ward, J.M., Kelly, W.B., Ichida, A.M., Gaber, R.F. anderson, J.A., Uozumi, N., Schroeder, J.I. and Crawford, N.M.** (1995). Multiple genes, tissue specificity and expression-dependent modulation contribute to functional diversity of potassium channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **109**, 1093-1106.
- Cerana, R., Giromini, L. and Colombo, R.** (1995). Malate-regulated channels permeable to anions in vacuoles of *Arabidopsis thaliana*. *Aust. J. Plant. Physiol.* **22**, 115-121.
- Champagnol, F.** (1984). Eléments de physiologie de la vigne et de viticulture générale. (Montpellier: Champagnol, F.).
- Chen, Z. and Gallie, D.R.** (2004). The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell* **16**, 1143-1162.
- Cherel, I.** (2004). Regulation of K<sup>+</sup> channel activities in plants: from physiological to molecular aspects. *J Exp Bot* **55**, 337-351.
- Church, G.W. and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 1991-1995.
- Clarkson, D.T.** (1993). Roots and the delivery of solutes to the xylem. *Phil. Trans. R. Soc. Lon. B* **341**, 5-17.
- Clegg, C.J. and Cox, G.** (1978). Anatomy and activities of plants. A guide to the study of flowering plants John Murray Eds, London.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
- Coombe, B.G.** (1976). The development of fleshy fruits. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **27**, 507-528.
- Coombe, B.G.** (1987). Distribution of solutes within the developing grape berry in relation to its morphology. *Am J Enol Viti* **38**, 120-127.
- Coombe, B.G.** (1992). Research on development and ripening of the grape berry. *Am J Enol Viti* **43**, 101-110.
- Cosgrove, D.J. and Hedrich, R.** (1991). Stretch-activated chloride, potassium and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* **186**, 143-153.

- Coursol, S., Fan, L.M., Le Stunff, H., Spiegel, S., Gilroy, S. and Assmann, S.M.** (2003). Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* **423**, 651-654.
- Creasy, G.L., Price, S.F. and Lombard, P.B.** (1993). Evidence for xylem discontinuity in Pinot noir and Merlot grapes : dye uptake and mineral composition during berry maturation. *Am J Enol Viti* **44**, 187-192.
- Czempinski, K., Zimmermann, S., Ehrhardt, T. and Muller-Röber, B.** (1997). New structure and function in plant  $K^+$  channels: KCO1, an outward rectifier with a steep  $Ca^{2+}$  dependency [published erratum appears in EMBO J 1997 Nov 17;16(22):6896]. *EMBO J* **16**, 2565-2775.

## D

- Daram, P., Urbach, S., Gaymard, F., Sentenac, H. and Cherel, I.** (1997). Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *EMBO J.* **16**, 3455 - 3463.
- de Boer, A.H. and Wegner, L.H.** (1997). Regulatory mechanisms of ion channels in xylem parenchyma cells. *J Exp Bot* **48**, 441-449.
- Decroocq, V., Fave, M.G., Hagen, L., Bordenave, L. and Decroocq, S.** (2003). Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theo App Genet* **106**, 912-922.
- Deeken, R., Geiger, D., Fromm, J., Koroleva, O., Ache, P., Langenfeld-Heyser, R., Sauer, N., May, S.T. and Hedrich, R.** (2002). Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. *Planta* **216**, 334-344.
- Delas, J., Molot, C. and Soyer, J.P.** (1989). Qualité et constitution des raisins de cuve. Fertilisation minérale de la vigne et teneurs en potassium des baies, des moûts et des vins. In 4ème Symposium International d'Oenologie-Actualités Oenologiques (Bordeaux).
- DeWitt, N.D. and Sussman, M.R.** (1995). Immunocytochemical localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump  $H^+$ -ATPase in phloem companion cells. *Plant Cell* **7**, 2035-2067.
- DeWitt, N.D., Harper, J.F. and Sussman, M.R.** (1991). Evidence for a plasma membrane proton pump in the phloem cells of higher plants. *Plant J* **1**, 121-128.
- Diatloff, E., Geiger, D., Shang, L., Hedrich, R. and Roberts, K.** (2004). Differential regulation of  $K^+$  channels in *Arabidopsis* epidermal and stelar root cells. *Plant cell env* **27**, 980-990.
- Donèche, B. and Chardonnet, C.** (1992). Evolution et localisation des principaux cations au cours du développement du raisin. *Vitis* **31**, 175-181.
- Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A.L., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. and Mackinnon, R.** (1998). The structure of the potassium channel: Molecular basis of  $K^+$  conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77.
- Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Müller-Röber, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, G. and Hedrich, R.** (1997). Plant  $K^+$  channel  $\alpha$ -subunits assemble indiscriminately. *Biophys J* **72**, 2143-2150.

- Duby, G., Oufattale, M. and Boutry, M.** (2001). Hydrophobic residues within the predicted N-terminal amphiphilic alpha-helix of a plant mitochondrial targeting presequence play a major role in in vivo import. *Plant J* **27**, 539-549.
- Düring, H., Lang, A. and Oggionni, F.** (1987). Patterns of water flow in Roesling berries in relation to developmental changes in their xylem morphology. *Vitis* **26**, 123-131.
- Dutruc-Rosset, G.** (2003). The state of vitiviniculture in the world and the statistical information in 2000. (Paris: O.I.V.).

## E

- Ehrhardt, T., Zimmermann, S. and Müller-Röber, B.** (1997). Association of plant K<sup>+</sup> in channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly. *FEBS Lett* **409**, 166-170.
- Epstein, E., Rains, D.W. and Elzam, O.E.** (1963). Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 3736-3740.
- Esau, K.** (1977). New York: John Wiley and sons. Anat seed plants.
- Evans, N.H., McAinsh, M.R. and Hetherington, A.M.** (2001). Calcium oscillations in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 415-420.

## F

- Fillion, L.** (1997). Aspects physiologiques, cytologiques et moléculaires des flux de glucides au cours de la maturation de la baie de raisin (*Vitis vinifera L.*). Thèse de doctorat (Poitiers: Université de Poitiers), pp. 136.
- Fillion, L., Ageorges, A., Picaud, S., Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R., Romieu, C. and Delrot, S.** (1999). Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiol* **120**, 1083-1093.
- Findlay, N., Oliver, K.J., Nii, N. and Coombe, B.G.** (1987). Solute accumulation by grape pericarp cells. IV. Perfusion of pericarp apoplast via the pedicel and evidence for xylem malfunction in ripening berries. *J Exp Bot* **38**, 668-679.
- Fischer, R.A. and Hsiao, T.C.** (1968). Stomatal opening in isolated epidermal strips of *Vicia faba*. II. Responses to KCl concentration and the role of potassium absorption. *Plant Physiol* **43**, 1953-1958.
- Franks, F. and Eagland, D.** (1975). The role of solvent interactions in protein conformation. *CRC Crit Rev Biochem* **3**, 165-219.
- Franks, P.J., Cowan, I.R. and Farquhar, G.D.** (1998). A study of stomatal mechanics using the cell pressure probe. *Plant Cell Env* **21**, 94-100.

## G

- Garcia-Mata, C. and Lamattina, L.** (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* **126**, 1196-1204.
- Garcia-Mata, C. and Lamattina, L.** (2003). Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure - is nitrate reductase one of the missing links? *Trends Plant Sci* **8**, 20-26.
- Garcia-Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills, A., Lamattina, L. and Blatt, M.R.** (2003). Nitric oxide regulates K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 11116-11121.
- Gassmann, W. and Schroeder, J.I.** (1994). Inward-Rectifying K<sup>+</sup> Channels in Root Hairs of Wheat (A Mechanism for Aluminum-Sensitive Low-Affinity K<sup>+</sup> Uptake and Membrane Potential Control). *Plant Physiol* **105**, 1399-1408.
- Gaymard, F., Cerutti, M., Horeau, C., Lemaillet, G., Urbach, S., Ravallec, M., Devauchelle, G., Sentenac, H. and Thibaud, J.B.** (1996). The baculovirus/insect cell system as an alternative to Xenopus oocytes. First characterization of the AKT1 K<sup>+</sup> channel from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **271**, 22863-22870.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferriere, N., Thibaud, J.B. and Sentenac, H.** (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell* **94**, 647-655.
- Gehring, C.A., McConchie, R.M., Venis, M.A. and Parish, R.W.** (1998). Auxin-binding-protein antibodies and peptides influence stomatal opening and alter cytoplasmic pH. *Planta* **205**, 581-586.
- Geiger, D., Becker, D., Lacombe, B. and Hedrich, R.** (2002). Outer pore residues control the H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> sensitivity of the *Arabidopsis* potassium channel AKT3. *Plant Cell* **14**, 1859-1868.
- Gibeaut, D.M., Hulett, J., Cramer, G.R. and Seemann, J.R.** (1997). Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiol* **115**, 317-319.
- Gilroy, S., Read, N.D. and Trewavas, A.J.** (1990). Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature* **346**, 769-771.
- Gu, Y., Franco, A., Jr., Gardner, P.D., Lansman, J.B., Forsayeth, J.R. and Hall, Z.W.** (1990). Properties of embryonic and adult muscle acetylcholine receptors transiently expressed in COS cells. *Neuron* **5**, 147-157.
- Guo, F.Q., Young, J. and Crawford, N.M.** (2003). The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 107-117.
- Gustafson, C.E., Levine, S., Katsura, T., McLaughlin, M., Aleixo, M.D., Tamarappoo, B.K., Verkman, A.S. and Brown, D.** (1998). Vasopressin regulated trafficking of a green fluorescent protein-aquaporin 2 chimera in LLC-PK1 cells. *Histochem Cell Biol* **110**, 377-386.
- Gutierrez-Granda, M.J. and Morrison, J.C.** (1992). Solute distribution and malic enzyme activity in developing grape berries. *Am J Enol Viti* **43**, 323-328.

# H

- Hale, C.R.** (1977). Relation between potassium and the malate and tartrate contents of grape berries. *Vitis* **16**, 9-19.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J.** (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**, 85-100.
- Hamilton, D.W., Hills, A., Kohler, B. and Blatt, M.R.** (2000).  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 4967-4972.
- Harris, J.M., Kriedermann, P.E. and Possingham, J.V.** (1968). Anatomical aspects of grape berry development. *Vitis* **7**, 291-298.
- Hartmann, H.A., Kirsch, G.E., Drewe, J.A., Taglialatela, M., Joho, R.H. and Brown, A.M.** (1991). Exchange of conduction pathways between two related  $\text{K}^+$  channels. *Science* **251**, 942-944.
- Hedrich, R., Busch, H. and Raschke, K.** (1990).  $\text{Ca}^{2+}$  and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *The EMBO J* **9**, 3889-3892.
- Hetherington, A.M.** (2001). Guard cell signaling. *Cell* **107**, 711-714.
- Hirsch, R.E., Lewis, B.D., Spalding, E.P. and Sussman, M.R.** (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**, 918-921.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. and Katz, B.** (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* **116**, 424-448.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholz, D., Rogers, S.G. and Fraley, R.T.** (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *science* **227**, 1229-1231.
- Hosoi, S., Iino, M. and Shimazaki, K.** (1988). Outward-rectifying  $\text{K}^+$  channels in stomatal guard cell protoplasts. *Plant Cell Physiol* **29**, 907-911.
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.A., Simonneau, T., Thibaud, J.B. and Sentenac, H.** (2003). The *Arabidopsis* outward  $\text{K}^+$  channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 5549-5554.
- Hrazdina, G., Parsons, G.F. and Mattick, L.R.** (1994). Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *Am J Enol Viti* **35**, 220-227.
- Hugnot, J.P., Salinas, M., Lesage, F., Guillemare, E., de Weille, J., Heurteaux, C., Mattei, M.G. and Lazdunski, M.** (1996). Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels. *Embo J* **15**, 3322-3331.
- Hurst, A.C., Meckel, T., Tayefeh, S., Thiel, G. and Homann, U.** (2004). Trafficking of the plant potassium inward rectifier KAT1 in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant J* **37**, 391-397.

- I**
- Illand, P.G. and Coombe, B.G.** (1988). Malate, tartrate, potassium and sodium in flesh and skin of Shiraz grapes during ripening : concentration and compartmentation. *Am J Enol Viti* **39**, 71-75.
- Isacoff, E.Y., Jan, Y.N. and Jan, L.Y.** (1991). Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Nature* **353**, 86-90.
- Ivashikina, N., Becker, D., Ache, P., Meyerhoff, O., Felle, H.H. and Hedrich, R.** (2001). K<sup>+</sup> channel profile and electrical properties of *Arabidopsis* root hairs. *FEBS Lett* **25503**, 1-7.
- Ivashikina, N., Deeken, R., Ache, P., Kranz, E., Pommerrenig, B., Sauer, N. and Hedrich, R.** (2003). Isolation of AtSUC2 promoter-GFP-marked companion cells for patch-clamp studies and expression profiling. *Plant J* **36**, 931-945.

## J

- Jona, R. and Botta, R.** (1988). Fruit set and early berry development in two grapevine cultivars. *Israël Journal of Botany* **37**, 203-216.
- Jung, J.Y., Kim, Y.W., Kwak, J.M., Hwang, J.U., Young, J., Schroeder, J.I., Hwang, I. and Lee, Y.** (2002). Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate are required for normal stomatal movements. *Plant Cell* **14**, 2399-2412.

## K

- Keller, U., Hedrich, R. and Raschke, K.** (1989). Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *nature* **341**, 450-453.
- Kerschensteiner, D., Monje, F. and Stocker, M.** (2003). Structural determinants of the regulation of the voltage-gated potassium channel Kv2.1 by the modulatory alpha-subunit Kv9.3. *J Biol Chem* **278**, 18154-18161.
- Ketchum, K.A. and Slayman, C.W.** (1996). Isolation of an ion channel gene from *Arabidopsis thaliana* using the H5 signature sequence from voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *FEBS Lett* **378**, 19-26.
- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K. and Goldstein, S.A.N.** (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376**, 690-695.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M. and Shimazaki, K.** (2001). Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**, 656-660.
- Kohler, B., Hills, A. and Blatt, M.R.** (2003). Control of guard cell ion channels by hydrogen peroxide and abscisic acid indicates their action through alternate signaling pathways. *Plant Physiol* **131**, 385-388.
- Koornneef, M., Jorna, M.L., Brinkhorst-van der Swam, D.L.C. and Karsen, C.M.** (1982). The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutant by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theo Appl Genet* **61**, 385-393.

**Kwak, J.M., Murata, Y., Baizabal-Aguirre, V.M., Merrill, J., Wang, M., Kemper, A., Hawke, S.D., Tallman, G. and Schroeder, J.I.** (2001). Dominant negative guard cell K<sup>+</sup> channels mutants reduced inward-rectifying currents and light-induced stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**, 473-485.

## L

- Lacombe, B. and Thibaud, J.-B.** (1998). Evidence for a multi-ion pore behavior in the plant potassium channel KAT1. *J Membr Biol* **166**, 91-100.
- Lacombe, B., Pilot, G., Gaymard, F., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B.** (2000a). pH control of the plant outwardly-rectifying potassium channel SKOR. *FEBS Lett* **466**, 351-354.
- Lacombe, B., Pilot, G., Michard, E., Gaymard, F., Sentenac, H. and Thibaud, J.-B.** (2000b). A shaker-like K<sup>+</sup> channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 837-851.
- Langer, K., Ache, P., Geiger, D., Stinzing, A., Arend, M., Wind, C., Regan, S., Fromm, J. and Hedrich, R.** (2002). Poplar potassium transporters capable of controlling K<sup>+</sup> homeostasis and K<sup>+</sup>-dependent xylogenesis. *Plant J* **32**, 997-1009.
- Lasceve, G., Leymarie, J. and Vavasseur, A.** (1997). Alteration in light-induced stomatal opening in a starch-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* L. deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Cell Env* **20**, 350-358.
- Lasceve, G., Leymarie, J., Olney, M.A., Liscum, E., Christie, J.M., Vavasseur, A. and Briggs, W.R.** (1999). *Arabidopsis* contains at least four independent blue-light-activated signal transduction pathways. *Plant Physiol* **120**, 605-614.
- Leckie, C.P., Mcainsh, M.R., Allen, G.J., Sanders, D. and Hetherington, A.M.** (1998). Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 15837-15842.
- Lehninger, A.L.** (1970). *Biochemistry*. (New-York: Worth Publisher).
- Leigh, R.A. and Wyn Jones, R.G.** (1984). A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytol* **97**, 1-13.
- Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F.C., Filleur, S., Daniel-Vedele, F. and Gojon, A.** (1999). Molecular and functional regulation of two NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant J* **18**, 509-519.
- Lemtiri-Chlieh, F., MacRobbie, E.A. and Brearley, C.A.** (2000). Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K<sup>+</sup>-inward rectifying conductance in guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8687-8692.
- Leonhardt, N., Bazin, I., Richaud, P., Marin, E., Vavasseur, A. and Forestier, C.** (2001). Antibodies to the CFTR modulate the turgor pressure of guard cell protoplasts via slow anion channels. *FEBS lett* **494**, 15-18.
- Leon-Kloosterziel, K.M., Gil, M.A., Ruijs, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A. and Koornneef, M.** (1996). Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J* **10**, 655-661.
- Lesage, F. and Lazdunski, M.** (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**, F793-801.

- Li, J., Wang, X.Q., Watson, M.B. and Assmann, S.M.** (2000). Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AACPK kinase. *Science* **287**, 300-303.
- Lin, C.** (2002). Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* **14 Suppl**, S207-225.
- Linder, B. and Raschke, F.** (1992). A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS Lett* **313**, 27-30.
- Locatelli, F., Vannini, C., Magnani, E., Coraggio, I. and Bracale, M.** (2003). Efficiency of transient transformation in tobacco protoplasts is independent of plasmid amount. *Plant Cell Rep* **21**, 865-871.
- Lopez, G.A., Jan, Y.N. and Jan, L.Y.** (1991). Hydrophobic substitution mutations in the S4 sequence alter voltage-dependent gating in Shaker K<sup>+</sup> channels. *Neuron* **7**, 327-336.
- Lopez, G.A., Jan, Y.N. and Jan, L.Y.** (1994). Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K<sup>+</sup> channel comprises part of the pore. *Nature* **367**, 179-182.
- Lu, P., Zhang, S.Q., Outlaw, W.H., Jr. and Riddle, K.A.** (1995). Sucrose: a solute that accumulates in the guard-cell apoplast and guard-cell symplast of open stomata. *FEBS Lett* **362**, 180-184.
- Luckow, V.A. and Summers, M.D.** (1988). Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* **167**, 56-71.
- Lukaszewicz, M., Jerouville, B., Boutry, M.** (1998). Signs of translational regulation within the transcript leader of a plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene. *Plant J.* **14**, 413-423.

## M

- Maathuis, F.J.M. and Sanders, D.** (1993). Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **191**, 302-307.
- Maathuis, F.J.M. and Sanders, D.** (1994). Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 9272-9276.
- Maathuis, F.J.M. and Sanders, D.** (1995). Contrasting roles in ion transport of two K<sup>+</sup>-channel types in root cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **197**, 456-464.
- Maathuis, F.J.M. and Sanders, D.** (1996). Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiol planta* **96**, 158-168.
- MacKinnon, R.** (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**, 232-235.
- MacKinnon, R. and Yellen, G.** (1990). Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Science* **250**, 276-279.
- MacRobbie, E.A.** (2002). Evidence for a role for protein tyrosine phosphatase in the control of ion release from the guard cell vacuole in stomatal closure. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 11963-11968.
- MacRobbie, E.A.C.** (1995). Effects of ABA on <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> fluxes at plasmalemma and tonoplast of stomatal guard cells. *Plant J* **7**, 835-843.

- MacRobbie, E.A.C.** (1998). Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philos. Trans. R. Soc. London B - Biol. Sci.* **353**, 1475-1488.
- MacRobbie, E.A.C.** (1999). Vesicle trafficking: a role in trans-tonoplast ion movements? *J Exp Bot* **50**, 925-934.
- Madeja, M.** (2000). Extracellular Surface Charges in Voltage-Gated Ion Channels. *News Physiol Sci* **15**, 15-19.
- Mansfield, T.A., Hetherington, A.M. and Atkinson, C.J.** (1990). Some current aspect of stomatal physiology. *Annu. Rev. Plant Physiolol Plant Mol Biol* **41**, 55 - 75.
- Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A. and Marion-Poll, A.** (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of Nicotiana plumbaginifolia, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *Embo J* **15**, 2331-2342.
- Marten, I., Lohse, G. and Hedrich, R.** (1991). Plant growth hormones control voltage-dependent activity of anion channels in plasma membrane of guard cells. *nature* **353**, 758-762.
- Marten, I., Gaymard, F., Lemaillet, G., Thibaud, J.B., Sentenac, H. and Hedrich, R.** (1996). Functional expression of the plant K<sup>+</sup> channel KAT1 in insect cells. *FEBS Lett* **380**, 229-232.
- Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y. and Maniatis, T.** (1981). Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system. *Cell* **27**, 279-288.
- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A. and Giraudat, J.** (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J* **25**, 295-303.
- Mitchell, P.** (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Naturwis* **191**, 144-148.
- Mitchell, P.** (1967). Translocations through natural membranes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **29**, 33-87.
- Morris, J.R., Sims, C.A. and Cawthon, D.L.** (1983). Effects of excessive potassium levels on pH, acidity and color of fresh and stored grape juice. *Am J Enol Viti* **34**, 35-39.
- Mott, K.A.** (1988). Do stomata respond to CO<sub>2</sub> concentrations other than intracellular? *Plant Physiol* **86**, 200-203.
- Mott, K.A. and Parkhurst, D.F.** (1991). Stomatal responses to humidity in air and helox. *Plant cell Env* **14**, 509-515.
- Mott, K.A. and Buckley, T.N.** (2000). Patchy stomatal conductance: emergent collective behaviour of stomata. *Trends Plant Sci* **5**, 258-262.
- Mott, K.A. and Franks, J.** (2001). The role of epidermal turgor in stomatal interactions following a local perturbation in humidity. *Plant Cell Env* **24**, 657-662.
- Mouline, K., Véry, A.-A., Gaymard, F., Boucherez, J., Pilot, G., Devic, M., Bouchez, D., Thibaud, J.-B. and Sentenac, H.** (2002). Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K<sup>+</sup> channel in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **16**, 339-350.
- Mpelasoka, B.S., Schachtman, D.P., Treeby, M.T. and Thomas, M.** (2003). A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation. *Aust. J. Plant. Physiol.* **9**, 154-168.

- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissues culture. *Physiol Plant* **15**, 473-497.
- Mustilli, A.C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F. and Giraudat, J.** (2002). Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14**, 3089-3099.

## N

- Nakamura, R.L. anderson, J.A. and Gaber, R.F.** (1997). Determination of key structural requirements of a K<sup>+</sup> channel pore. *J. Biol. Chem.* **272**, 1011-1018.
- Nakamura, R.L., McKendree Jr, W.L., Hirsch, R.E., Sedbrook, J.C., Gaber, R.F. and Sussman, M.R.** (1995). Expression of an Arabidopsis potassium channel gene in guard cells. *Plant Physiol* **109**, 371-374.
- Negrutiu, I., Hinnidaels, S., Cammaerts, D., Cherdshewasart, W., Gharti-Chhetri, G. and Jacobs, M.** (1992). Plant protoplasts as genetic tool: selectable markers for developmental studies. *Int. J. Dev. Biol.* **36**, 73-84.
- Neher, E. and Sakmann, B.** (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.
- Ng, C.K., Carr, K., McAinsh, M.R., Powell, B. and Hetherington, A.M.** (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* **410**, 596-599.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y. and Minamino, N.** (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**, 121-127.

## O

- Ollat, N.** (1997). Bases physiologiques et anatomiques de la croissance des baies de *Vitis vinifera* cv Cabernet Sauvignon. In Thèse de doctorat (Montpellier: ENSA-Montpellier), pp. 131.
- Ottschytsch, N., Raes, A., Van Hoorick, D. and Snyders, D.J.** (2002). Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7986-7991.
- Outlaw, W.H. and De Vlieghere-He, X.** (2001). Transpiration rate. An important factor controlling the sucrose content of the guard cell apoplast of broad bean. *Plant physiol.* **126**, 1716-1724.
- Outlaw, W.H., Jr.** (1983). Current concepts on the role of potassium in stomatal movements. *Physiol Plant* **59**, 302-311.

## P

- Pandey, S. and Assmann, S.M.** (2004). The *Arabidopsis* putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* **16**, 1616-1632.
- Pantoja, O., Dainty, J. and Blumwald, E.** (1992). Cytoplasmic chloride regulates cation channels in the vacuolar membrane of plant cells. *J Membr Biol* **125**, 219-229.
- Papazian, D.M. and Bezanilla, F.** (1997). How does an ion channel sense voltage? *News Physiol Sci* **12**, 203-210.
- Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Jan, Y.N. and Jan, L.Y.** (1987). Cloning of the genomic and complementary DNA from *Shaker*, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **237**, 749-753.
- Papazian, D.M., Shao, X.M., Seoh, S.A., Mock, A.F., Huang, Y. and Wainstock, D.H.** (1995). Electrostatic interactions of the S4 voltage sensor in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* **14**, 1293-1301.
- Patel, A.J., Lazdunski, M. and Honore, E.** (1997). Kv2.1/Kv9.3, a novel ATP-dependent delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes. *Embo J* **16**, 6615-6625.
- Patrick, J.W.** (1997). PHLOEM UNLOADING: Sieve Element Unloading and Post-Sieve Element Transport. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 191-222.
- Pei, Z.M., Ward, J.M., Harper, J.F. and Schroeder, J.I.** (1996). A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *The EMBO J* **15**, 6564-6574.
- Pei, Z.M., Kuchitsu, K., Ward, J.M., Schwarz, M. and Schroeder, J.I.** (1997). Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *The Plant Cell* **9**, 409-423.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E. and Schroeder, J.I.** (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**, 731-734.
- Philipp, K., Ivashikina, N., Ache, P., Christian, M., Luthen, H., Palme, K. and Hedrich, R.** (2004). Auxin activates KAT1 and KAT2, two K<sup>+</sup>-channel genes expressed in seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **37**, 815-827.
- Pilot, G., Gaymard, F., Mouline, K., Cherel, I. and Sentenac, H.** (2003a). Regulated expression of *Arabidopsis* shaker K<sup>+</sup> channel genes involved in K<sup>+</sup> uptake and distribution in the plant. *Plant Mol Biol* **51**, 773-787.
- Pilot, G., Pratelli, R., Gaymard, F., Meyer, Y. and Sentenac, H.** (2003b). Five group-distribution of the Shaker-like K<sup>+</sup> channel family in higher plants. *J Mol Evol* **56**, 418-434.
- Pilot, G., Lacombe, B., Gaymard, F., Cherel, I., Boucherez, J., Thibaud, J.B. and Sentenac, H.** (2001). Guard cell inward K<sup>+</sup> channel activity in *Arabidopsis* involves expression of the twin channel subunit KAT1 and KAT2. *J. Biol. Chem.* **276**, 3215-3221.
- Ping, Z., Yabe, I. and Muto, S.** (1992). Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in the plasma membrane and the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* **1112**, 287-290.
- Plautz, J.D., Day, R.N., Dailey, G.M., Welsh, S.B., Hall, J.C., Halpin, S. and Kay, S.A.** (1996). Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. *Gene* **173**, 83-87.
- Pössner, D.R.E. and Kliewer, W.M.** (1985). The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis* **24**, 229-240.

- Post, M.A., Kirsch, G.E. and Brown, A.M.** (1996). Kv2.1 and electrically silent Kv6.1 potassium channel subunits combine and express a novel current. *FEBS Lett* **399**, 177-182.
- Pratelli, R., Lacombe, B., Torregrosa, L., Gaymard, F., Romieu, C., Thibaud, J.B. and Sentenac, H.** (2002). A grapevine gene encoding a guard cell K<sup>+</sup> channel displays developmental regulation in the grapevine berry. *Plant Physiol* **128**, 564-577.
- Pratt, C.** (1971). Reproductive anatomy in cultivated grapes - A review. *Am J Enol Viti* **22**, 93-109.

## R

- Raschke, K.** (1979). Movements of stomata. *Encycl Plant Physiol*, W.Haupt and M.F. Feinleib, eds, 384-441.
- Raven, J.A.** (2002). Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytol* **153**, 371-386.
- Reimann, F. and Ashcroft, F.M.** (1999). Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 503-508.
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K. and Hedrich, R.** (2002). AtKC1, a silent *Arabidopsis* potassium channel alpha -subunit modulates root hair K<sup>+</sup> influx. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 4079-4084.
- Roberts, S.K.** (1998). Regulation of K<sup>+</sup> channels in maize roots by water stress and abscisic acid. *Plant Physiol* **116**, 145-153.
- Roberts, S.K. and Tester, M.** (1995). Inward and outward K<sup>+</sup>-selective currents in the plasma membrane of protoplasts from maize root cortex and stele. *The Plant J* **8**, 811-825.
- Robinson, R.B. and Siegelbaum, S.A.** (2003). Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* **65**, 453-480.
- Roelfsema, M.R., Steinmeyer, R., Staal, M. and Hedrich, R.** (2001). Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *Plant J* **26**, 1-13.
- Roelfsema, M.R., Hanstein, S., Felle, H.H. and Hedrich, R.** (2002). CO<sub>2</sub> provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant J* **32**, 65-75.
- Roelfsema, M.R.G. and Prins, H.B.A.** (1997). Ion channels in guard cells of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **202**, 18-27.
- Roux, B. and MacKinnon, R.** (1999). The cavity and pore helices the KcsA K<sup>+</sup> channel: Electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* **285**, 100-102.
- Ruffner, H.P.** (1982). Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis* : A review - Part B. *Vitis* **21**, 346-358.
- Rychkov, G.Y., Pusch, M., Astill, D.S., Roberts, M.L., Jentsch, T.J. and Bretag, A.H.** (1996). Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel ClC-1. *J Physiol* **497** ( Pt 2), 423-435.

# S

- Salinas, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Hugnot, J.P. and Lazdunski, M.** (1997). New modulatory alpha subunits for mammalian Shab K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* **272**, 24371-24379.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edn. (Cold Spring Harbor:).
- Sanchez, J.P., Duque, P. and Chua, N.H.** (2004). ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA-responsive genes in Arabidopsis. *Plant J* **38**, 381-395.
- Satter, R. and Galston, A.** (1981). Mechanisms of control of leaf movements. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **32**, 83-110.
- Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Lucas, W.J. and Gaber, R.F.** (1992). Expression of an inward-rectifying potassium channel by the Arabidopsis KAT1 cDNA. *Science* **258**, 1654-1658.
- Schmidt, C., Schelle, I., Liao, Y.J. and Schroeder, J.I.** (1995). Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9535-9539.
- Schroeder, J. and Fang, H.H.** (1991). Inward-rectifying K<sup>+</sup> channels in guard cells provide a mechanism for low-affinity K<sup>+</sup> uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 11583-11587.
- Schroeder, J.I. and Hagiwara, S.** (1989). Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **338**, 427-430.
- Schroeder, J.I. and Hagiwara, S.** (1990). Repetitive increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca<sup>2+</sup> permeable channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 9305-9309.
- Schroeder, J.I. and Keller, B.U.** (1992). Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5025-5029.
- Schroeder, J.I., Hedrich, R. and Fernandez, J.M.** (1984). Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* **312**, 361-362.
- Schroeder, J.I., Raschke, K. and Neher, E.** (1987). Voltage-dependence of K<sup>+</sup> channels in guard-cell protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4108-4112.
- Schroeder, J.I., Schmidt, C. and Sheaffer, J.** (1993). Identification of high-affinity slow anion channel blockers and evidence for stomatal regulation by slow anion channels in guard cells. *Plant Cell* **5**, 1831-1841.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M. and Waner, D.** (2001). Guard Cell Signal Transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 627-658.
- Schulz-Lessdorf, B., Dietrich, P., Marten, I., Lohse, G., Busch, H. and Hedrich, R.** (1994). Coordination of plasma membrane and vacuolar membrane ion channels during stomatal movement. *Symp Soc Exp Biol* **48**, 99-112.
- Schwartz, A., Ilan, N., Schwarz, M., Scheaffer, J., Assmann, S.M. and Schroeder, J.I.** (1995). Anion-Channel Blockers Inhibit S-Type Anion Channels and Abscisic Acid Responses in Guard Cells. *Plant Physiol* **109**, 651-658.
- Senn, M.E., Rubio, F., Banuelos, M.A. and Rodriguez-Navarro, A.** (2001). Comparative functional features of plant potassium HvHAK1 and HvHAK2 transporters. *J Biol Chem* **276**, 44563-44569.

- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroûte, F., Salmon, J.M., Gaymard, F. and Grignon, C.** (1992). Cloning and expression in yeast of plant potassium ion transport system. *Science* **256**, 663 - 665.
- Serrano, R.** (1989). Structure and function of plant plasma membrane ATPase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**, 61-94.
- Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H. and Galbraith, D.W.** (1995). Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J* **8**, 777-784.
- Silacci, M.W. and Morrison, J.C.** (1990). Changes in pectin content of Carbernet Sauvignon grape berries during maturation. *Am J Enol Viti* **41**, 111-115.
- Smith, J.A.C.** (1991). Ion transport and the transpiration stream. *Bot. Acta* **104**, 416-421.
- Staxen, I.I., Pical, C., Montgomery, L.T., Gray, J.E., Hetherington, A.M. and McAinsh, M.R.** (1999). Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 1779-1784.
- Stoev, K. and Ivantchev, V.** (1977). Données nouvelles sur le problème de la translocation descendante et ascendante des produits de la photosynthèse de la vigne. *Vitis* **16**, 253-262.
- Storey, R.** (1987). Potassium localization in the grape berry pericarp by energy-dispersive X-ray microanalysis. *Am J Enol Viti* **38**, 301-309.
- Stühmer, W.** (1998). Electrophysiologic recordings from *Xenopus* oocytes. *Meth enzym* **293**, 280-300.
- Suhita, D., Raghavendra, A.S., Kwak, J.M. and Vavasseur, A.** (2004). Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiol* **134**, 1536-1545.
- Sumikawa, K., Houghton, M., Emtage, J.S., Richards, B.M. and Barnard, E.A.** (1981). Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Nature* **292**, 862-864.
- Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M.R.G., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., Palme, K. and Hedrich, R.** (2001). KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 2917-2921.

## T

- Talbott, L. and Zeiger, E.** (1996). Central roles for potassium and sucrose in guard-cell osmoregulation. *Plant Physiol.* **111**, 1051-1057.
- Talbott, L.D. and Zeiger, E.** (1993). Sugar and organic acid accumulation in guard cells of *Vicia faba* in response to red and blue light. *Plant Physiol.* **102**, 1163 - 1169.
- Talbott, L.D. and Zeiger, E.** (1998). The role of sucrose in guard cell osmoregulation. *J. Exp. Bot.* **49**, 329-337.
- Talbott, L.D., Shmayaevich, I.J., Chung, Y., Hammad, J.W. and Zeiger, E.** (2003). Blue light and phytochrome-mediated stomatal opening in the npq1 and phot1 phot2 mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **133**, 1522-1529.
- Tanke, I.N., Blaudez, D., Maathuis, F.J. and Sanders, D.** (2003). CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends Plant Sci* **8**, 286-293.

- Tallman, G. and Zeiger, E.** (1988). Light quality and osmoregulation in *Vicia* guard cells (evidence for involvement of three metabolic pathways). *Plant Physiol.* **88**, 887 - 895.
- Tanner, W. and Beevers, H.** (2001). Transpiration, a prerequisite for long-distance transport of minerals in plants? *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 9443-9447.
- Thiel, G., Blatt, M.R., Fricker, M.D., White, I.R. and Millner, P.** (1993). Modulation of K<sup>+</sup> channels in *Vicia* stomatal guard cells by peptide homologs to the auxin-binding protein C terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11493-11497.
- Toro, L., Wallner, M., Meera, P. and Tanaka, Y.** (1998). Maxi-K<sub>Ca</sub>, a unique member of the voltage-gated K channel superfamily. *News Physiol Sci* **13**, 112-117.
- Torregrosa, L.** (1998). A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L. *Vitis* **37**, 91-92.

## U

- Ukomadu, C., Zhou, J., Sigworth, F.J. and Agnew, W.S.** (1992). mu1 Na<sup>+</sup> channels expressed transiently in human embryonic kidney cells: biochemical and biophysical properties. *Neuron* **8**, 663-676.
- Ulens, C. and Tytgat, J.** (2001). Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem* **276**, 6069-6072.
- Uozumi, N., Nakamura, T., Schroeder, J.I. and Muto, S.** (1998). Determination of transmembrane topology of an inward-rectifying potassium channel from *Arabidopsis thaliana* based on functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9773-9778.

## V

- Van Duijn, B., Ypey, D.L. and Libbenga, K.R.** (1993). Whole-Cell K<sup>+</sup> Currents across the Plasma Membrane of Tobacco Protoplasts from Cell-Suspension Cultures. *Plant Physiol* **101**, 81-88.
- Vega-Saenz de Miera, E.C.** (2004). Modification of Kv2.1 K<sup>+</sup> currents by the silent Kv10 subunits. *Brain Res Mol Brain Res* **123**, 91-103.
- Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N.V. and Adelman, J.P.** (1998). Calcium-activated potassium channels. *Cur Opin Neurobiol* **8**, 321-329.
- Very, A.A. and Sentenac, H.** (2003). Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 575-603.
- Vorobiev, L.N.** (1967). Potassium ion activity in the cytoplasm and the vacuole of cells of Chara and Griffithsia. *Nature* **216**, 1325-1327.
- Vreugdenhil, D.** (1985). Source-sink gradient of potassium in the phloem. *Planta* **163**, 238-240.

# W

- Walker, D.J., Leigh, R.A. and Miller, A.J.** (1996). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 10510-10514.
- Wang, X.Q., Ullah, H., Jones, A.M. and Assmann, S.M.** (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* **292**, 2070-2072.
- Ward, J.M. and Schroeder, J.I.** (1994). Calcium-activated K<sup>+</sup> channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell* **6**, 669-683.
- Wegner, L.H. and Raschke, K.** (1994). Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots: a procedure to isolate protoplasts from this tissue and a patch-clamp exploration salt passageways into xylem vessels. *Plant Physiol* **105**, 799-813.
- Wegner, L.H. and De Boer, A.H.** (1997). Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K<sup>+</sup> homeostasis and long-distance signaling. *Plant Physiol* **115**, 1707-1719.
- Winkler, A., Cook, J., Lider, J.A. and Kliewer, W.M.** (1974). General viticulture. (Berkeley: University of California press).
- Woodward, F.I.** (1998). Do plant really need stomata? *J Exp Bot* **49**, 471-480.

# X Y Z

- Xue, T., Marban, E. and Li, R.A.** (2002). Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization. *Circ Res* **90**, 1267-1273.
- Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T. and MacKinnon, R.** (1991). Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel. *Science* **251**, 939-941.
- Yool, A. and Schwarz, T.L.** (1991). Alteration of ionic selectivity of a K<sup>+</sup> channel by mutation of the H5 region. *Nature* **349**, 700-704.
- Zeiger, E.** (1983). The biology of stomatal guard cells. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **34**, 441 - 475.
- Zhao, R., Moriau, L. and Boutry, M.** (1999). Expression analysis of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase pma4 transcription promoter from *Nicotiana plumbaginifolia* activated by the CaMV 35S promoter enhancer. *Plant science* **149**, 157-165.
- Zimmermann, S. and Sentenac, H.** (1999). Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. *Cur Opin Plant Biol* **2**, 477-482.
- Zimmermann, U., Meinkner FC, Zhu JJ, Schneider H, Goldstein G, Kuchenbrod E and Haase A.** (1994). Xylem water transport : is the available evidence consistent with the cohesion theory ? *Plant Cell Env* **17**, 1169-1181.

## **Propriétés fonctionnelles et rôles physiologiques de canaux K<sup>+</sup> de type Shaker chez *Arabidopsis thaliana* et *Vitis vinifera***

Chez les végétaux, les canaux potassiques de la famille Shaker jouent un rôle majeur dans le contrôle de la perméabilité de la membrane au K<sup>+</sup>: ils semblent constituer dans de nombreux types cellulaires la principale voie d'entrée ou de sortie de cet ion. Au cours de ma thèse, j'ai contribué à l'analyse de l'activité et du rôle *in planta* de deux canaux d'*Arabidopsis thaliana* et d'un canal de vigne, par des approches essentiellement de physiologie et d'électrophysiologie. (i) GORK est le canal sortant majeur des cellules de garde, son activité permet de rapides fermetures stomatiques en réponse à divers stimuli, menant à une économie d'eau non négligeable surtout chez des plantes en stress hydrique. (ii) AtKC1 code une sous unité qui régule l'activité d'autres canaux Shaker comme AKT1 et KAT1. L'analyse du phénotype du mutant AtKC1 révèle que ce gène intervient très probablement dans le contrôle de l'homéostasie potassique, entraînant, quand son activité est supprimée, une altération de l'équilibre hydrique de la plante. (iii) VvSOR code un canal sortant exprimé dans les parties aériennes de la vigne et plus particulièrement dans les baies de raisin. L'analyse phénotypique des vignes surexprimant le canal SOR a révélé des baies de raisin présentant un excès de taille pouvant aller jusqu'à 60 %, ainsi qu'un enrichissement en tartrate et acide tartrique par rapport au malate et acide malique. Ces résultats donnent des pistes pour améliorer les pratiques culturelles dans une région comme le Languedoc où l'excès en K<sup>+</sup> du sol entraîne un manque d'acidité du vin.

Mots clés: Canaux, potassium, *Arabidopsis*, vigne, stomate, baies de raisin

## **Functional properties and physiological roles of Shaker type K<sup>+</sup> channel in *Arabidopsis thaliana* et *Vitis vinifera***

Shaker K<sup>+</sup> channels are the mains determinants of the membrane permeability to potassium in numerous plant cell types. My PhD work has consisted in the study of the physiological role of two *Arabidopsis thaliana* and one *Vitis vinifera* channel. (i) GORK is the major outwardly rectifying channel expressed in guard cell, its activity allowed rapid stomatal closure and so a water economy in water stressed plant. (ii) AtKC1 encodes a AKT1 and KAT1 regulatory sub-unit. Phenotypic analyse of a KO mutant has revealed that AtKC1 probably allows to control the K<sup>+</sup> homeostasis and hydric status. (iii) VvSOR encodes a outwardly rectifying channel expressed in vine aerial part and more particularly in berries. Phenotypical analyse of VvSOR overexpression lines have revealed that berries possessing a 60% more important size and a relative reaching in tartaric acid vs malic acid without modifying K<sup>+</sup> content. This phenotype are agronomically interesting for lands where the soil possessed K<sup>+</sup> excess as Languedoc which produce wine lacking of acidity.

Keywords: Charnel, potassium, *Arabidopsis*, vine, stomata, berries